Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Validação de método e triagem de cádmio no sistema de produção de carne em pasto

Janaina Rosolem Lima

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagem

Piracicaba
2011

Aos meus pais, ***Celso Manoel de Lima e Sandra Maria Rosolem Lima***,

que sempre estiveram ao meu lado me amando incondicionalmente, aconselhando, acreditando em minhas decisões e acima de tudo torcendo pelo meu crescimento...

Aos meus irmãos, ***Samara e Júnior***, pelas brincadeiras, apoio durante o caminho até aqui e principalmente pela cumplicidade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Obrigada a **Deus** pela vida, pela família e amigos que ao meu lado me deram forças e determinação para jamais desanimar ou sentir-me vencida pelas dificuldades.

A toda minha família, **meus pais Celso e Sandra, irmãos Samara e Júnior**, que mesmo estando em Tangará da Serra jamais deixaram de expressar seu apoio e crença no meu sucesso.

Obrigada aos meus **avós Carlos e Áurea, tio Paulo e tia Sinair, tio Jorge, tia Pim e Rafael** pelo amor e carinho.

Agradeço ao meu orientador **Professor Luiz Gustavo Nussio** pelo incentivo, compreensão e confiança no meu trabalho. Mas acima de tudo pelos ensinamentos, exemplos e orientação que foram além do mestrado...foram para a vida.

Obrigada a equipe do COI no Lanagro-SP/ Campinas, **Helena Müller Queiroz, Maristela Braga Martins Teixeira, Érika Ferreira Silva, Roberto Gonçalves dos Reis**, porque mais que uma equipe de trabalho são grandes amigos que me guiaram com carinho e paciência por todo o percurso do mestrado. Sem sua ajuda e amizade o caminho teria sido trilhado de forma completamente diferente.

Aos grandes amigos do QCF, **Maity, Rafael, Adir, João, Sérgio (Porcão), Edward, Tânia, Daniel, Álvaro e todos os estagiários que estiveram presentes durante minha permanência no mestrado**, muito obrigada pela amizade, brincadeiras, descontrações e

consideração, pois sem esses momentos com certeza o ânimo para trabalhar não seria o mesmo!!!!

À minha família piracicabana, **Alice Cassetari, Thyssia Bomfim, Wiolene Nordi, Tarcila Silva e Ricardo Zanon**, pelo carinho, aprendizado, conselhos, broncas, festas, risadas, enfim pela felicidade de sempre estarem presentes no meu dia-a-dia.

À um amigo muito especial, **Alonso José de Resende Júnior**, pela partilha das viagens a Campinas, conversas, encrencas, risadas e acima de tudo confiança a mim concedida.

À amiga **Daiane Placido Torres**, pela paciência e dedicação em dividir comigo seus conhecimentos contribuindo muito para o desenvolvimento deste trabalho. Mas também aos vários momentos de descontração no laboratório, conselhos e conversas. Meu muito obrigado!!

Ao **Professor Flávio Portela Santos e o Mestre Luiz Roberto Dell Agostinho Neto**, pela oportunidade de trabalho em conjunto que possibilitou o desenvolvimento da fase a campo deste trabalho.

Ao **Lanagro-SP** pela concessão da oportunidade de bolsa e também apoio em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que felizmente conheci em Piracicaba e Campinas, amizades que pretendo levar para a vida toda.

EPÍGRAFE

"Quem vive estudando, mas nunca repete o
que aprendeu, se parece com quem vive
semeando, mas nunca ceifa"

Talmude

SUMÁRIO

RESUMO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO E TRIAGEM DE CÁDMIO NO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CARNE EM PASTO

Os contaminantes inorgânicos, entre eles o cádmio (Cd), estão associados a efeitos negativos na saúde humana e animal. Este projeto, em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, foi desenvolvido com o objetivo de validar método analítico para determinação de Cd em matriz de alface para extensão de aplicabilidade em outras matrizes vegetais. A otimização e validação foram realizadas no Lanagro-SP em Campinas, sendo testadas as técnicas de digestão via seca, digestão via úmida em forno micro-ondas e suspensão ácida. A suspensão ácida propiciou melhores recuperações (70 a 110%), maior simplicidade de preparo e economia de reagentes, logo foi a técnica selecionada para validação. O método consiste em pesagem de 0,5 g de alface moído, adição de 2,5 mL de ácido nítrico, sonicação durante 20 minutos, tempo de reação de 2 horas e 20 minutos de centrifugação. As análises estatísticas consistiram em cálculo da média aritmética e coeficiente de variação entre replicatas de amostras. Para validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão com material de referência certificado, recuperação, seletividade ou efeito matriz, limite de detecção e quantificação, repetitividade e reprodutibilidade. Todos os experimentos da validação realizados até o momento estão de acordo com o requerido pelo Regulamento (CE) 657/2002 e INMETRO. As análises estatísticas consistiram basicamente em avaliação da média aritmética, desvio-padrão e coeficiente de variação. Após validação, o método foi utilizado para estudo de caso com amostras provenientes de experimento conduzido na USP/ESALQ – Piracicaba com 63 bovinos de corte desmamados ½ Nelore x ½ Canchim em *B. brizantha* sob lotação rotacionada, com terminação em confinamento. O delineamento foi em blocos completos casualizados com três tratamentos e três repetições: T_1 – sal mineral *ad libitum*; T_2 – sal mineral + milho (0,3% do peso vivo – PV); T_3 – sal mineral + milho (0,6% até 0,9% PV). Foram amostrados pasto, feno (Tifton – 85), milho, sorgo, farelo de soja, solo, água, rins e fígado. As amostras vegetais foram preparadas pela técnica de suspensão ácida e os tecidos por calcinação, todos analisados por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). Na triagem algumas amostras estiveram abaixo do limite de quantificação (LQ) dentre elas a pastagem (13 µg kg^{-1}), farelo de soja e milho (8 µg kg^{-1}) e água (0,0025 mg L^{-1}), ao passo que feno e sorgo permaneceram acima do L.Q. porém abaixo do limite máximo permitido (200 µg kg^{-1}). O solo com pH ácido de 5,4 com 1,5 mg kg^{-1} de Cd. As amostras de fígado apresentaram teor abaixo do LQ (22 µg kg^{-1}) e as de rim abaixo do máximo permitido (1000 µg kg^{-1}). Não houve diferença entre tratamentos. Utilizou-se estatística descritiva para amostras vegetais e transformação logarítmica (10) nos dados de rim pelo SAS com médias comparadas pelo teste t a 5%. Não foram encontrados teores prejudiciais de Cd neste estudo.

Palavras-chave: Contaminante; GF AAS; Suspensão; Validação; Vegetais; Bovinos

ABSTRACT

Method validation and screening of cadmium on beef cattle pastures production

The inorganic contaminants like cadmium (Cd) are toxic to human and animal health. This work, accomplished with Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, had the purpose to validate an analytical method for Cd determination in lettuce samples and other vegetables samples. The development and validating steps were made on Lanagro-SP in Campinas. The techniques tested were dry ashing, microwave digestion and slurry. The slurry method had best recoveries (70 % up to 110%), the simplest preparing with less reagents, so it was selected to be validate. After optimizing the experimental parameters, the steps of the method were the following: weighting 0.5 g of ground lettuce; addition of 2.5 mL of HNO_3 distilled; 20 minutes of sonication; 2 hours of standing and 20 minutes of centrifugation after volume completed for 25 mL. The statistical analyses were did evaluating means and relative standard deviation of the experiments. To validate the method the sensibility, linearity, precision and accuracy with certified reference material, recovery, matrix effects, limit of detection, limit of quantification, repeatability and reproducibility. All the experiments that have been done until now are in accordance with Comission Decision (CD) 2002/657/EC and INMETRO. The statistical analyses were basic the same at the development period. After the validation, the method was used in a screening with samples from ESALQ/USP – Piracicaba experiment using 63 ½ Nelore x ½ Canchim beef steers, under a rotational grazing system in B. brizantha, finishing animals in feedlot. The experimental design was a randomized block with three treatments and three replications: T_1 - mineral supplementation (MS) ad libitum; T_2 - MS + corn (0.3% body weight – BW); T_3 - MS + corn (0.6% up to 0.9% BW). Samples of pasture, hay (Tifton – 85), corn, sorghum, soybean meal, soil, water, kidney and liver were collected. Vegetables samples were prepared by acid slurry and animal tissues by dry ashing, and then all analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). Some samples were under limit of quantification (LOQ) like pasture (13 μg kg^{-1}), soybean meal and corn (8 μg kg^{-1}) and water (0.0025 mg L^{-1}), while hay and sorghum were bellow acceptable levels (200 μg kg^{-1}). Soil pH was 5.4 with a Cd content of 1.5 mg kg^{-1}. The liver samples were under LOQ (22 μg kg^{-1}) and kidney samples were bellow acceptable levels (1000 μg kg^{-1}, FB).There was no difference between treatments. The vegetables data were submitted to descriptive statistics, while kidney means were transformed by log (10) on SAS and compared by t test in 5% level. No hazardous Cd concentrations were observed in this trial.

Keywords: Beef cattle; Contaminant; GF AAS; Slurry; Validation; Vegetables

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, sendo também o maior exportador mundial de carne (MAPA, 2008; ANUALPEC, 2008). A atividade pecuária rendeu ao Brasil 4,1 bilhões de dólares em 2008 representando 29,3% da produção nacional. Segundo a ANUALPEC (2008) a projeção é que em 2017 o Brasil seja responsável por suprir 40% do crescimento da demanda mundial por carne. Esta demanda futura, juntamente com o potencial elevado de produção, garante vantagens na consolidação deste mercado. Para isso, o país deverá adaptar-se às exigências dos consumidores quanto à certificação de qualidade dos alimentos produzidos.

O “boi verde” é que abastece o mercado nacional e internacional. Logo, é de suma importância atenção para os diversos pontos críticos da produção. A triagem de contaminantes inorgânicos nesta cadeia produtiva, tem se revelado importante uma vez que o teor de metais em alimentos vem se destacando em relação à qualidade e à segurança alimentar (ADAMS et al., 2003). Este monitoramento pode ser realizado empregando protocolos validados capazes de detectar os limites máximos de contaminantes impostos por organizações como *Codex Alimentarius Commission*, requeridos pelos países importadores e, desta forma, garantir que a carne seja considerada saudável e também merecedora de preço diferenciado por isso.

Levando-se em consideração a possível presença de contaminantes nos ingredientes da alimentação animal têm sido mobilizados esforços para verificação de metodologias capazes de determinar a presença destes metais nos solos e nos vegetais, base alimentar dos animais de produção e diretamente do homem. Entretanto, muitas pesquisas são ainda necessárias para elucidar os processos de transferência destes contaminantes através dos níveis tróficos.

Esta apreensão reside no fato destes contaminantes serem extremamente prejudiciais a saúde humana. Estudos demonstram que no córtex renal humano, concentrações de aproximadamente 200 $\mu g\ g^{-1}$ de Cd geram danos nos túbulos proximais com desequilíbrio na excreção de Ca, P, glicose, aminoácidos e pequenos peptídeos na urina, sendo que estas perdas podem conduzir a diminuição de deposição mineral nos ossos e susceptibilidade a fraturas (FOX, 1987).

Com esta preocupação, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou em 1995 o Plano Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) (BRASIL, 1995) em carnes e posteriormente no ano de 1999, com a inclusão de contaminantes inorgânicos, ficou instituído então o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) (BRASIL, 1999) monitorando os elementos cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênio (As).

Em 2008 (BRASIL, 2008), o MAPA realizou a ampliação do escopo do PNCRC para matrizes vegetais, sendo aprovado em 2009 (BRASIL, 2009) o PNCRC/Vegetal. Dentre os vegetais inseridos no programa para o ano de 2009/2010 estão: abacaxi, alface, amendoim, arroz, banana, batata, castanha-do-Pará, limão, lima ácida, maçã, mamão, manga, melão, milho, morango, pimenta do reino, tomate, feijão, soja, trigo e uva. Para execução deste plano, faz-se necessário o estabelecimento de protocolos de análise adequados à determinação dos contaminantes inorgânicos. A literatura apresenta protocolos para a determinação destes contaminantes em matrizes biológicas utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) (ZHAO et al., 2004; MAMANI et al., 2005; ADAMS et al., 2003; SILVA et al., 2003). Atualmente o Brasil não possui nenhum protocolo oficial validado que atenda às exigências da Comunidade Européia (CE) para a determinação de contaminantes inorgânicos neste perfil de matrizes.

Por meio do PNCRC o MAPA propende instituir meios confiáveis de fiscalização das substâncias prejudiciais desta natureza. Como a CE é o mercado mais exigente para as exportações brasileiras, os protocolos do MAPA visam seguir suas legislações. Nos Regulamentos (CE) n° 629/2008 e (CE) nº 1881/2006 estão estabelecidos os níveis de cádmio para carne bovina (exceto miúdos) como fígado com 0,50 mg kg^{-1} e rim com 1,0 mg kg^{-1}. Nos mesmos regulamentos também estão dispostos limites para alguns vegetais como soja, feijão, arroz, trigo e folhas com 0,2 mg kg^{-1} e milho com 0,1 mg kg^{-1}, sendo todos estes teores expressos em base de matéria natural.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para determinação de Cd em matrizes vegetais de acordo com os regulamentos estabelecidos pela Comunidade Européia, para que desta forma fosse de contribuição direta e imediata para o ramo de exportação de carne e produtos vegetais do agronegócio nacional como também para a saúde pública. Nesse sentido, do ponto de vista zootécnico, pode-se também conceituar o tema como atributo relativo à qualidade da alimentação animal e também humana.

Referências

ADAMS, M.L; CHAUDRY, A.M.; ROUSSEAU, I; McGRATH, S. A practical evaluation of microwave and conventional wet digestion techniques for the determination of Cd, Cu And Zn in wheat grain. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry,** Abingdon, v. 83, n. 4, p. 307 – 314, Apr. 2003.

BRASIL. **Portaria n. 527**, de 15 de agosto de 1995. Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em produtos de origem animal (PNCRB). **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 ago. de 1995. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em 14 dez. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 dez. de 1999. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 14 dez. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 42, de 31 de dezembro de 2008. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 jan. 2009. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 14 dez. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 21, de 30 junho de 2009. Aprova os Programas Nacionais de Controle de Resíduos e Contaminantes para as culturas agrícolas de abacaxi, alface, amendoim, arroz, banana, batata, castanha-do-Brasil, limão, lima ácida, maçã, mamão, manga, melão, milho, morango, pimenta do reino, tomate e uva de que trata o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal para o período de 2009/2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jul. 2009. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 14 dez. 2010.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1881/2006, de 19 de Dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 20 Dezembro. 2006. p. 5 - 24.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 629/2008, de 02 de julho 2008. Altera o Regulamento (CE) nº 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 3 de Julho de 2008. p. 6 – 9.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Anualpec 2008:** Anuário da pecuária brasileira. São Paulo, 2008. p. 67.

MAMANI, M.C.V; ALEIXO, L.M; ABREU, M.F; RATH, S. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 709-713, Apr. 2005.

SILVA, J.B.B; BORGES, D.L.G; VEIGA, M.A.M.S; CURTIUS, A.J; WELZ, B. Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, n. 5, p. 977-982, July. 2003.

ZHAO, F.J. Factors affecting the concentrations of lead in British wheat and barley grain. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p. 461-468, Oct. 2004.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cádmio

Entre os contaminantes inorgânicos presentes nas matrizes cárneas e vegetais pode-se citar o cádmio (Cd). É designado contaminante devido à ação tóxica ao homem, animal e vegetais, sendo que esta ação é dependente de sua concentração, forma química e distribuição na água, solo e ar; absorção e distribuição na planta que será consumida pelo animal ou ser humano; retenção e metabolismo no organismo animal e humano (KABATA-PENDIAS, 2001; DOWDY e VOLK, 1983; PANDEY e PANDEY, 2009). Devido a isso há grande preocupação da comunidade científica com respeito a sua presença na cadeia alimentar humana.

O Cd está presente naturalmente no ambiente frequentemente associado ao elemento Zn, sendo que a forma valente mais abundante é o Cd^{+2}. No solo normalmente está presente em baixas concentrações sendo provenientes da decomposição do seu material de origem (DAVIES, 1992 apud CHANEY et al., 1998). Contudo estas concentrações podem ser fortemente alteradas por intromissões do ser humano como aplicação de pesticidas, adubos químicos e orgânicos, precipitação atmosférica de regiões com grande quantidade de indústrias, cinzas, calcário e aplicação de biossólidos (DOWDY e VOLK, 1983; TAMANINI et al., 2005).

Segundo Dowdy e Volk (1983), a ocorrência de contaminantes inorgânicos no solo pode sobrevir em sítios de troca específicos com outros metais, incorporados dentro ou na superfície cristalina de precipitados inorgânicos, óxidos primários, complexados com componentes da matéria orgânica, precipitados na forma de sais insolúveis ou estarem solúveis na solução do solo. Sua mobilidade no solo é controlada principalmente pelo pH e teor de argila, sendo mais móvel em ambientes ácidos e pouco argilosos (KABATA-PENDIAS, 2001). Dowdy e Volk (1983) citam trabalhos em que foi observada retenção de até 95% do Cd aplicado no solo na faixa de profundidade até 30 cm, evidenciando sua baixa translocação.

As plantas têm menor tolerância ao Cd do que os animais, logo ao passo que podem ser via de entrada deste elemento para a cadeia alimentar tornam-se também barreiras contra sua mobilização do solo para os alimentos de consumo humano (CHANEY et al., 1998). De forma geral o Cd é considerado de fácil absorção pelos vegetais, porém a presença de óxidos (Fe, Al, e Mn), tipo de argila do solo, alto pH e teor de matéria orgânica (formação de quelatos insolúveis) são fatores influentes na sua absorção (TAMANINI et al., 2005).

Uma vez absorvido, a translocação dentro da planta depende de alguns fatores como movimento no xilema e floema, acumulação e reações de imobilização. O Cd existente nas folhas pode migrar para outros tecidos, principalmente para a raiz. A intensidade da movimentação entre tecidos é dependente de vários fatores, como o órgão de destino, a idade da planta e o elemento envolvido (KABATA-PENDIAS, 2001). Para autores como Zhao et al., (2004) a translocação de contaminantes inorgânicos a partir de tecidos vegetativos para os grãos é extremamente baixa ou nula, devido ao seu efeito tóxico para as plantas, o que parece ser desencadeado por um mecanismo que impede o seu acúmulo na parte reprodutiva.

Desta forma os contaminantes inorgânicos parecem ter maior acúmulo na parte vegetativa da planta, ou seja, os grãos tendem a possuir menores quantidades destes elementos (GARCIA et al., 1981; GARCIA et al., 1979). Uma fração destes elementos absorvida pela folha pode ser lixiviada pela água da chuva, sendo que diferenças no grau desta lixiviação estão relacionados as funções metabólicas dos elementos existentes neste tecido. Kabata-Pendias (2001) comenta que o Cd não é um elemento de fácil lixiviação por apresentar maior profundidade de deposição. O trabalho de Aitken (1997) segure que o Cd adere-se fortemente ao tecido foliar da forragem e que sua taxa de declínio está mais ligada a morte e emissão de tecidos do que ao efeito de lixiviação causado pela chuva sendo esta adesão proveniente não somente de partículas do solo, mas também da atmosfera. Pandey e Pandey (2009) realizando experimentos em campo aberto e casa de vegetação encontraram forte contribuição do ar na concentração final de Cd em folhas de culturas agrícolas.

Devido os vegetais constituírem dieta tanto do homem como dos animais de produção torna-se importante a análise de Cd nos mesmos, pois podem constituir via de entrada deste elemento na alimentação humana (AITKEN, 1997). Devido o Cd ser elemento não-essencial tanto ao organismo animal quanto vegetal sua absorção via gastrointestinal ocorre por meio de competição pela via de absorção de outros elementos de interesse ao organismo, o que torna a absorção pelos pulmões (30 a 60%) mais eficiente (PHILLIPS, 2004).

O Cd na dieta animal pode causar perda de peso, anemia, abortos, falhas renais, interferir na produção de vitamina D, e consequentemente, na absorção do Ca (NRC, 1980a apud FOX, 1987; PHILLIPS, 2004). Além disso, o cádmio também interfere na absorção de elementos essenciais, sistemas enzimáticos, pode inibir a fosforilação oxidativa, é fator predisponente a disfunção renal, tumor e necrose dos testículos, arteriosclerose, danos no sistema nervoso central,

inibição do crescimento, e danos aos microvilos das células da parte proximal do intestino delgado que é o principal ponto de absorção deste elemento (PHILLIPS, 2004).

Está bem estabelecido que os principais tecidos de acumulação de Cd, em animais e também no homem, são o rim e o fígado (GARCIA et al., 1979; GARCIA et al., 1981). O estudo de Heffron (1980) com ovelhas alimentadas por 274 dias com silagem de milho proveniente de solo adubado com lodo de esgoto detectou pequenas necroses no fígado, com suspeitas de que o Cd possa ter algum efeito inibitório sobre a respiração celular. O mesmo autor encontrou que aumentos no teor de Cd na dieta geraram acréscimos no teor de Cd no tecido hepático das ovelhas, mas o mesmo não foi observado para o tecido muscular que é o principal produto de consumo humano.

No córtex renal humano, concentrações de Cd aproximadas a 200 $\mu g\ g^{-1}$ geram danos nos túbulos proximais com desequilíbrio na excreção de Ca, P, glicose, aminoácidos e pequenos peptídeos na urina, sendo que estas perdas podem conduzir a diminuição de deposição mineral nos ossos e susceptibilidade a fraturas (FOX, 1987).

A ocorrência de contaminantes inorgânicos no tecido animal pode ser proveniente de sua presença no solo, água e/ou ingredientes da dieta. Logo, faz-se importante o monitoramento da presença desses elementos nas matrizes cárneas e vegetais, pois além de servirem ao consumo interno são produtos de exportação. No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos, utiliza-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA.

2.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite – GF AAS

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) é uma das técnicas mais recomendadas para análise de elementos traços em materiais biológicos (NOMURA e OLIVEIRA, 2006). Embora simples, necessita de considerável habilidade no desenvolvimento de métodos para o preparo de amostras, etapa esta que constitui ponto crítico das análises de elementos traços.

Entre as vantagens que tornam a técnica popular é que não necessita de atenção constante do analista, possui maior precisão com uso de pipetador automático e a maioria dos métodos

envolve apenas a dissolução das amostras em solvente adequado e introdução direta no tubo de grafite, pois a técnica permite trabalho com alto nível de sólidos dissolvidos (NOMURA e OLIVEIRA, 2006; TYLER, 2011).

Correia et al. (2003) descrevem em sua publicação os avanços realizados por diversos pesquisadores ao longo da história da espectrometria de absorção atômica, destacando entre elas, as condições STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace), um conjunto de requisitos instrumentais e operacionais que possibilita mais sensibilidade e menor interferência em análises utilizando ETAAS. Estes autores listam as seguintes condições: utilizar tubo de grafite com plataforma de L'Vov; trabalhar com área do sinal de absorvância; grafite pirolítico como material do atomizador; aquecimento transversal do tubo de grafite; utilização de efeito Zeeman para correção de fundo; interrupção do fluxo de gás durante a etapa de atomização; elevada taxa de aquecimento do tubo de grafite e eletrônica adequada para permitir a integração do sinal transiente.

Segundo Tyler (2011) existe poucos interferentes espectrais nesta técnica, sendo estes quase eliminados quando utiliza-se o corretor de fundo com efeito Zeeman. O mesmo comenta que maiores temperaturas de secagem ajudam na minimização do sinal de fundo durante a atomização, além de utilização de modificadores químicos. Os modificadores têm função de estabilizar o analito de interesse a temperaturas mais elevadas ou aumentando a volatilidade dos concomitantes possibilitando sua eliminação (TYLER, 2011). Correia et al. (2003) comentam que o sucesso do modificador é dependente da matriz em questão e cita muitos exemplos de matrizes e seus respectivos modificadores, sendo que para alimentos é sugerido utilizar $NH_4H_2PO_4$ + Mg.

Referências

AITKEN,M.N. Short-term leaf surface adhesion of heavy metals following application of sewage sludge to grassland. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 52, n. 1, p. 73 – 85, Mar. 1997.

CHANEY,R.L; BROWN, S; ANGLE, J.S. Soil-Root Interface: Ecosystem health and human food-chain protection. In:HUANG, P.M. **Soil chemistry and ecosystem health – SSSA Special Publication Number 52**. Madison: Soil Science Society of America, 1998. chap. 10 p. 279 – 311.

CORREIA, P.R.M.; NOMURA, C.S.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de absorção atômica multielementar: desafios e perspectivas. **Revista Analítica**, São Paulo, n. 5, p. 52 – 59, Jun/Jul. 2003.

DOWDY, R.H.; VOLK, V.V. Moviment of heavy metals in soils. In: CHMN. D.W.; ELRICK, D.E. TANJI, K.K**.** Chemical mobility and reactivity in soil systems: proceedings of a symposium. Madison: Soil Science Society of America, 1983. Chap. 15, p. 229 – 240.

FOX, M.R.S. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 65, p. 1744 – 1752, 1987.

GARCIA, W. J.; BLESSIN, C.W.; SANDFORD, H.W.; INGLETT, G.E. Translocation and accumulation of sevem heavy metals in tissues of corn plants grown on sludge-treated strip-mined soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 27, n. 5, p. 1088-1094, May. 1979.

GARCIA, W. J.; BLESSIN, C.W.;INGLETT, G.E.; KWOLEK,W.F. Metal accumulation and crop yield for a variety of edible crops grow in diverse soil media amended with sewage sludge. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 15, n. 07, p. 793 - 804. July. 1981.

HEFFRON, C. L. ;REID, J.T. ;ELFVING, D.C.;STOEWSAND, G.S.; HASCHEK,W.M.; TELFORD, J.N.; FURR, K.A.;PARKINSON, T.F. ;BACHE, C.A.; GUTENMANN, W.H. Cadmium and zinc in growing sheep fed silage corn grown on municipal sludge-amended soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 1, p. 58-61, Jan. 1980.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soil and plants**. 3th ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.

NOMURA, C.S.; OLIVEIRA, P.V. Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 234-239, Jan. 2006.

PANDEY, J; PANDEY, U. Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 148, n. 1/4, p. 61-74, 2009.

PHILLIPS, C.J.C.; CHIY, P.C.; OMED, H.M. The effects of cadmium in feed, and its amelioration with zinc, on element balance in sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 2489-2502, 2004.

TAMANINI, C.R.; ANDREOLI, C.V.; MOTTA, A.C.V.; CARNEIRO, C. Teor de metais pesados no solo e absorção pelo milheto em área degradada tratada com altas doses de biossólido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005. Campo Grande – MS. **Anais...** Campo Grande – MS 13 a 18 set. 2005. p. 1-15.

TYLER, G. **ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared**. Jobin Yvon Horiba ICP Optical Emission Spectroscopy Technical Note 05. Jobin Yvon: Edison, New Jersey. Disponível em: http://www.jobinyvon.com/usadivisions/Emission/applications/TN05.pdf . Acesso em: 23 abril 2011.

ZHAO, F.J. Factors affecting the concentrations of lead in British wheat and barley grain. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p. 461-468, Oct. 2004.

3 OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA PREPARO DE AMOSTRAS VEGETAIS

Resumo

Os avanços instrumentais na área da química analítica possibilitam análise rápida e precisa de contaminantes inorgânicos pela técnica de GF AAS. Entretanto a etapa de preparo das amostras permanece como ponto crítico tanto no sentido de agilidade quanto de qualidade do preparo. A literatura relata técnicas de preparo de amostra adequadas à determinação de Cd por GF AAS, sendo elas com completa ou parcial destruição da matriz. Neste trabalho foram exploradas as técnicas de preparo de amostra por calcinação, digestão em forno micro-ondas e suspensão para amostras vegetais (milho, soja, feijão, trigo, arroz e alface) com o objetivo de otimizar o método mais adequado para a determinação de Cd em produtos para exportação. Os resultados analíticos para o método empregando calcinação apresentaram valores de recuperação inferiores a 80% (desempenho mínimo requerido nas análises) para todas a seis matrizes, além de apresentar coeficientes de variação altos, o que culminou em renúncia da técnica. A digestão em forno micro-ondas mostrou-se eficiente no preparo de amostras vegetais, pois apresentou recuperações satisfatórias, entre 80% e 110%, e coeficientes de variação abaixo de 10%. Porém, no decorrer dos experimentos constatou-se que a capacidade máxima de amostra a ser digerida no micro-ondas (1,0 g de massa seca) é insuficiente para atingir os limites de quantificação requeridos pelas legislações internacionais. Logo, este método não pôde ser selecionado devido a esta limitação. A técnica de suspensão ácida foi eficiente na extração de Cd nas seis matrizes investigadas neste trabalho, apresentando recuperações médias de 90% com coeficientes de variação abaixo de 5%. Deste modo, ficaram estabelecidas as seguintes etapas para o método de preparo de amostra na forma de suspensão: pesagem de 1,0 g para alface e 3,0 g para grãos (etapa realizada após lavagem e secagem das amostras em estufa a 80 °C por mínimo de 48 horas); adição de 2,5 mL de HNO_3 destilado abaixo da temperatura de ebulição; 20 minutos de sonicação; 2 horas de repouso, e 20 minutos de centrifugação após completar o volume da amostra para 25,0 mL com água desionizada. As condições de temperatura para a determinação de Cd por GF AAS foram 550 °C para pirólise e 1300 °C para atomização, empregando 3 µg de $Mg(NO_3)_2$ e 50 µg de $NH_4H_2PO_4$ como modificadores químicos.

Palavras-chave: Cádmio; Digestão ácida em micro-ondas; Forno mufla; Suspensão; Vegetais; GF AAS

Abstract

The advances in the analytical chemistry area enable speed and precise analyze samples by GF AAS technique, however the sample preparation step remains as critical point such as in speed as in quality in general. The literature describes sample preparation techniques suitable for plant samples treatment for Cd determination by GF AAS, being some of them with complete or partial decomposition of the matrices. In this work three methods for sample preparation, which were dry ashing, microwave-assisted acid digestion and slurry technique, were investigated for vegetables samples analyses (seeds of corn, soybean, bean, wheat, rice and leaves of lettuce) aiming a method for Cd determination and inspection of production and export of grain from Brazil by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. The results for dry ashing were unsatisfactory because the recovery values were lower than 80% (minimal performance required for analyzes) for all six matrices, and relative standard deviation (RSD) unacceptably high, which implied the abandonment of this sample preparation technique. The microwave method was efficient to prepare plant material because obtained good recoveries, between 80% and 110%, and RSD lower than 10%. Nevertheless, the maximum quantity of sample that is possible to be mineralized in the microwave oven (1.0 g of dry matter) is not enough to produce the minimum concentration of 1 µg L^{-1} (first point of the calibration curve) when the fortification is 20% of the maximum allowable contaminant content, like required by the European Community legislation. Considering this aspect, the microwave-assisted acid digestion was not selected. The slurry method, based on nitric acid extraction, was efficient for the Cd extraction for all six matrices investigated, achieving recoveries around 90% and RSD lower than 5%. After optimizing the experimental parameters, the steps of the method were the following: weighting 0.5 g of lettuce and 3.0 g of grains (after washing and drying the samples in dry oven at 80 °C by at least 48 hours); addition of 2.5 ml of HNO_3 distilled in a quartz sub-boiling apparatus; 20 minutes of sonication; 2 hours of standing and 20 minutes of centrifugation after volume completed for 25 mL. The temperature conditions for Cd determination by GF AAS were pyrolysis temperature of 550 °C and atomization temperature of 1300 °C, using 3 µg of $Mg(NO_3)_2$ e 50 µg of $NH_4H_2PO_4$ as chemical modifiers.

Key words: Cadmium; Microwave-assisted acid digestion; Dry ashing; Slurry; Plant samples; GF AAS

3.1 Introdução

O preparo de amostras permanece como etapa crítica em análise de alimentos e pode influenciar os dados emitidos nos laudos e suas conseqüências (ADAMS et al., 2003).

As análises para a determinação de Cd, há mais de 10 anos atrás, eram apontadas por baixa acurácia dos resultados devido a erros de amostragem, contaminação, perdas durante o manuseio da amostra, pré-tratamentos, decomposição e outras etapas dos procedimentos (VIÑAS et al., 2000). Isso leva a considerar que metodologias para determinação de contaminantes inorgânicos devem, sempre que possível, ser o mais simples e rápidas, juntamente com o menor limite de detecção alcançável.

A maioria dos procedimentos para a determinação de elementos inorgânicos por ETAAS (Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy) necessita que as amostras sejam submetidas a alguma forma de destruição de sua fração orgânica para que haja disponibilização de forma inorgânica dos macro e microelementos (HOENIG et al., 1998; AFRIDI et al., 2007). Os métodos mais tradicionais de mineralização de matrizes envolvem calcinação em mufla e digestão via úmida usando blocos digestores ou forno microondas (ADAMS et al., 2003; HOENIG et al., 1998; JORHEM, 1995).

A técnica de calcinação consiste na queima da matéria orgânica da amostra utilizando temperatura elevada e o gás oxigênio do ar como agente oxidante restando apenas a fração inorgânica (cinzas), solúvel em ácido diluído (MAGALHÃES et al., 2008). Normalmente os resíduos encontrados de matéria orgânica são extremamente baixos (<0,1%, m/m) (JORHEM, 1995). Comumente a decomposição de amostras biológicas, como tecido vegetal, conduzidas em forno tipo mufla necessitam de temperaturas entre 450°C a 550°C para completo processo de calcinação (HOENIG et al., 1998). Já para tecido animal, como o fígado, temperaturas próximas a 450°C mostram-se eficientes sem que ocorra perda significativa dos analitos (MAGALHÃES et al., 2008).

Em muitos procedimentos não há necessidade de reagentes para queima da amostra, porém quando adicionados suas funções são acelerar a oxidação, prevenir volatilização dos analitos e reação entre componentes das cinzas com o material do cadinho, sendo os mais comuns o ácido nítrico e nitrato de magnésio. Por ser oxidante, o ácido nítrico torna a queima da amostra mais fácil devido à parcial destruição da matéria orgânica, já o nitrato (adicionado como solução

aquosa) ajuda a desprender as cinzas durante o processo de decomposição. Quando os aditivos são utilizados, geralmente inclui-se mais uma etapa à metodologia de preparo, procede-se a secagem em estufa antes de serem introduzidas no forno mufla (MAGALHÃES et al., 2008).

Outra técnica amplamente utilizada é a decomposição via úmida com forno micro-ondas. Uma de suas principais aplicações é para determinação de elementos traços utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). A decomposição é rápida, utiliza menor volume de reagentes (menor evaporação comparada ao bloco digestor), normalmente não é sensível a contaminação e tem alta taxa de reação (JORHEM e ENGMAN, 2000), pois após atingir as temperaturas máximas programadas, a pressão dentro dos vasos de reação aumenta rapidamente devido a formação de CO_2 e outros gases provenientes da decomposição do material orgânico (WU et al., 1997). Adams et al. (2003) comparando o desempenho do forno microondas e bloco digestor na determinação de metais em material de referência certificado (grãos de trigo) encontraram valores de recuperação próximos para os dois métodos, demonstrando a eficiência do forno microondas para este fim e sua equivalência em eficiência ao bloco digestor.

Dentre as vantagens da decomposição por radiação micro-ondas estão o menor tempo requerido de preparo das amostras em comparação com o forno mufla e bloco digestor, utilização de menor quantidade de ácido, poder de controle de temperatura e pressão nos vasos de reação, redução dos riscos de contaminação e minimização das perdas de analitos voláteis (ADAMS et al., 2003; HOENIG et al., 1998). Entre as desvantagens, tem-se que a velocidade de digestão das amostras torna-se menos importante à medida que aumentam o número de amostras para análise, grande tempo requerido para resfriamento e limpeza dos vasos, limitante número de vasos por rodada (algumas posições são ocupadas por brancos de amostra e de reagente, além de amostras controle ou de recuperação) e resulta em soluções muito diluídas (JORHEM e ENGMAN, 2000; ADAMS et al., 2003). A digestão em microondas é recomendada em situações em que menores concentrações de sólidos dissolvidos são necessárias.

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de elementos traços, sendo de interesse da ciência viabilizar a análise direta de amostras sólidas por esta técnica para desta forma otimizar a velocidade e praticidade destas análises (MILLER-IHLI, 1989; TOKMAN, 2007). Logo, o preparo de amostra em suspensão

mostra-se como alternativa para este fim, pois embora possa ser considerada como amostragem sólida não ocasiona digestão da amostra, apenas solubilização do analito para o meio extrator.

Experimentos relatados na literatura demonstram boa concordância entre resultados de determinação de metais provenientes de digestão ácida e suspensões, em que quanto maior a quantidade de analito extraída para a fase líquida mais a precisão irá se aproximar da digestão convencional (AFRIDI et al., 2007; FILGUEIRAS et al., 2000; VIÑAS et al., 2000).

Esta técnica é considerada extremamente prática (TOKMAN, 2007). Dentre suas vantagens pode-se citar a maior liberdade de ajuste da concentração de amostra nas soluções, não necessita de prévio processo de digestão das amostras, mínimo manuseio da amostra, curto tempo para preparo e consequentemente menores riscos de contaminação e perdas de analito por volatilização e/ou retenção em resíduos insolúveis (MILLER-IHLI, 1989; TOKMAN, 2007). Porém como toda técnica, também possui algumas desvantagens como maior probabilidade de erros volumétricos devido a variação do tamanho de partícula (MAJIDI et al., 1990), maiores sinais de fundo, taxas variáveis de atomização e até mesmo parcial obstrução do feixe de luz sobre a amostra (VIÑAS et al., 2000).

Nesta técnica, a quantidade de massa utilizada é um parâmetro de suma importância, sendo que suspensões mais concentradas tendem a apresentar queda de precisão e aumento de fundo devido a maior introdução de matéria orgânica dentro do tubo de grafite, formação mais abundante de aglomerados de massa que dificultam a homogeneização da solução e o aumento de sinal é linear até certo ponto, sendo que após isto aumentam-se as interferências e os erros sistemáticos (LIMA et al., 1999; FILGUEIRAS et al., 2000; AFRIDI et al, 2007).

Recurso utilizado para amenização da heterogeneidade gerada pela formação dos aglomerados de massa na amostragens com suspensão é a radiação ultrassom, pois a mesma promove melhora em extrações de metais e consequentemente na precisão do método (MILLER-IHLI, 1989). O ultrassom causa a quebra das partículas por meio do fenômeno de cavitação (formação de microbolhas em meio líquido ocasionados pela aplicação de grande pressão negativa sobre o meio) aumentando a superfície de reação partícula-diluente (FILGUEIRAS et al., 2000). Afridi et al. (2007) estudaram a eficiência do perfil de sonicação (em sonda ou em banho ultrassônico) juntamente com o tempo de sonicação. Os mesmo observaram que a eficiência do método escolhido está intimamente ligado a interação analito-matriz e a forma de dissipação da radiação ultrassom o que por conseqüência altera o melhor tempo de sonicação.

Utilizar agentes complexantes, como Triton X-100, podem também colaborar para diminuir a heterogeneidade das suspensões, mesmo porque estes agentes podem retardar a velocidade de sedimentação das partículas o que também auxilia na precisão dos resultados (VIÑAS et al., 2000). Porém há indícios que estes agentes possam atuar de forma negativa na pipetagem por causar adesão da solução no lado exterior do pipetador ou incompleta liberação da alíquota dentro do tubo devido aumento da viscosidade da solução de amostra (MILLER-IHLI, 1994; MILLER-IHLI, 1988; MILLER-IHLI, 1989).

Outro fator importante na técnica de suspensões é a granulometria, pois a mesma influencia as porcentagens de recuperação (MAJIDI et al., 1990; FILGUEIRAS et al., 2000). Tamanhos menores proporcionam soluções mais homogêneas sendo que este fator, juntamente com o diluente utilizado, afeta a quantidade de analito extraída para a fase líquida (MILLER-IHLI, 1994).

3.2 Materiais e Métodos

Todos os ensaios laboratoriais foram conduzidos no Laboratório Nacional Agropecuário em Campinas (Lanagro – SP) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As matrizes estudadas neste trabalhado para determinação do Cd^{+2} consistiram em soja, feijão, trigo, arroz, milho e alface, as quais foram divididas em três grupos: oleaginosas, cereais e vegetais folhosos. As otimizações foram conduzidas com espécie representante de cada grupo e posteriormente testadas nas outras matrizes do grupo. Normalmente as espécies de otimização foram arroz, soja e alface.

Os alimentos geralmente são analisados frescos (JORHEM e ENGMAN, 2000), porém, devido a os grãos serem colhidos em armazéns com probabilidade de contaminação por poeira durante o transporte e também na estocagem, decidiu-se lavar as matrizes para remoção de possível contaminação que não seja proveniente da absorção da planta. Os vegetais foram pesados *in natura*, seguidamente lavados em água corrente por três vezes e finalmente em água desionizada (VIÑAS et al., 1993), obtida em resistência específica de 18MΩcm (modelo Milli-Q integral A10 System, marca Millipore) também por três vezes, ou até visualização de água de lavagem límpida durante o processo. Após a lavagem, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada (modelo 320E, marca FANEM) por tempo mínimo de 24 horas a 80°C,

ou até atingirem peso constante. Após a secagem as amostras foram novamente pesadas para determinação da matéria seca e moídas em moinho analítico (modelo ZM 200, marca Retsch®) até obtenção de tamanho de partícula igual ou inferior a 500µm para posterior submissão aos processos de decomposição. Durante a moagem das amostras foram preparadas alíquotas de cada uma das seis matrizes para o período de validação.

As fortificações realizadas em todos os ensaios foram conduzidas de acordo com o teor máximo do contaminante (TMC) estabelecido pela Comunidade Européia (CE 1881/2006 e CE 629/2008) para cada matriz.

Todo o material utilizado para as análises foi lavado em detergente (deixado *overnight* em cuba contendo detergente neutro e água), enxaguado com água destilada, posteriormente mantido em solução ácido nítrico 5% (*overnight)* e enxaguado com água desionizada por três vezes antes da utilização.

Os resultados originados durante os períodos de otimização de cada método foram obtidos por leitura em GF AAS nas condições de leitura das amostras de carne do Lanagro-SP em curva de calibração realizada com solução padrão de Cd.

3.2.1 Otimização do preparo por calcinação

Foram realizados experimentos com preparo de amostras por calcinação em forno mufla alterando-se parâmetros como massa de amostra, programa de aquecimento, reagentes e suas concentrações.

Os principais ensaios descritos estão dispostos resumidamente na tabela 3.1. O primeiro ensaio foi executado segundo Mamani et al. (2005) com algumas alterações. Utilizando balança de precisão (modelo Mark 500C, marca Tecnal) foram pesados, em cadinho de porcelana, 1 g de amostra seca moída com tamanho de partícula ≤ 500µm. Logo após, adicionou-se padrão de Cd 1 µg mL^{-1} (marca VHG LABS, concentração da solução estoque de 1000 mg L^{-1}) com teor de adição de acordo com a matriz sendo então conduzidas ao forno mufla (modelo 3-1750, marca Ney Vulcan) em temperatura de 500ºC durante 2,5 h. Posteriormente, adicionou-se em cada amostra 2 mL de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} (marca Merck concentração 37%), seguido de aquecimento em chapa aquecedora (modelo 208-D, marca Nova Ética) em temperatura de 200 ºC até a completa evaporação da fase líquida. Após a evaporação, adicionaram-se 5 mL de HCl 2

mol L^{-1} com permanência dos cadinhos em chapa aquecedora, também a 200°C, até inicio da ebulição. Os resíduos foram lavados com mais 5 mL de HCl 2 mol L^{-1} e transferidos (filtrados em papel filtro) para balão volumétrico de 25 mL, sendo avolumadas com água desionizada.

Tabela 3.1 – Principais experimentos realizados durante o período de otimização do método de preparo via seca

Ensaios	Massa	Reagentes	Programação	Observações
1°	1 g	2 mL HCl 6 mol L^{-1} 5 mL HCl 2 mol L^{-1}	500 °C/ 2,5 horas	
2°	1 g	2 mL HCl 6 mol L^{-1} 5 mL HCl 2 mol L^{-1}	160 °C/ 1 hora 500 °C/ 2,5 horas	
3°	2 g	2 mL HNO_3 6 mol L^{-1} 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1}	160 °C/ 1 hora 500 °C/ 2,5 horas	
4°	1 g	2 mL HNO_3 6 mol L^{-1} 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1}	160 °C/ 1 hora 500 °C/ 2,5 horas	$Mg(NO_3)_2$
*5°	1 g	2 mL HNO_3 6 mol L^{-1} 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1}	160 °C/ 1 hora 500 °C/ 2,5 horas	$Mg(NO_3)_2$
*6°	3 g	2 mL HNO_3 6 mol L^{-1} 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1}	100 °C/ 1 hora 300 °C/ 1 hora 500 °C/ 4 horas	$Mg(NO_3)_2$
*7°	3 g	2 mL HNO_3 6 mol L^{-1} 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1}	100 °C/ 1 hora 300 °C/ 1 hora 500 °C/ 4 horas	$Mg(NO_3)_2$; aquecimento em chapa duas vezes
*8°	3 g	2 mL HNO_3 50% HNO_3 5% (q.s.p. 25 mL)	160 °C/ 1 hora 500 °C/ 4 horas	$Mg(NO_3)_2$; aquecimento em chapa duas vezes
*9°	2 g	2 mL HNO_3 50% HNO_3 5% (q.s.p. 25 mL)	160°C/ 1 hora 500°C/ 2,5 horas	$Mg(NO_3)_2$; aquecimento em chapa duas vezes

*Testes realizados apenas com a matriz arroz.

No segundo ensaio foi testada nova programação de aquecimento da mufla com primeira rampa de 160°C por 1 hora e a segunda de 500°C por 2,5 horas, repetindo-se todo o

procedimento anteriormente descrito (Tabela 3.1). No terceiro ensaio foram mantidas as sequências de preparo e programação de aquecimento, porém procedeu-se aumento de massa para 2 g e ao invés de HCl empregou-se HNO_3 6 mol L^{-1} e 2 mol L^{-1} (marca Vetec). Em um quarto experimento optou-se por testar o modificador químico nitrato de magnésio 6,67% ($Mg(NO_3)_2$) (Tabela 3.1). Foi utilizado 1 g de amostra, sendo realizada a adição de 750 µL de $Mg(NO_3)_2$ e a amostra umedecida com água desionizada e homogeneizada com baqueta de vidro. Logo após, as amostras permaneceram em estufa de ventilação de ar forçado por 24 horas, sendo então inseridas diretamente no forno mufla. Seguidamente foram adicionados 2 mL de HNO_3 6 mol L^{-1} às amostras, as quais permaneceram em chapa aquecedora à temperatura de 200 °C até completa evaporação da fase aquosa. Logo após a evaporação, adicionaram-se 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1} e após início da ebulição da solução, transferiu-se o conteúdo para balão de 25 mL, completando-se o volume com água desionizada. Devido aos resultados não terem sido satisfatórios repetiu-se o mesmo experimento utilizando somente a matriz arroz, sendo denominado arroz A as amostras com modificador e arroz B as amostras sem modificador (ensaio 5).

No sexto ensaio (Tabela 3.1) pesaram-se 3 g de amostra e nova programação de aquecimento foi testada, sendo todos os demais procedimentos do experimento 5 mantidos inalterados.

No sétimo ensaio pesaram-se 3 g de amostra, sendo realizada a adição de 750 µL de $Mg(NO_3)_2$ e a amostra umedecida com água desionizada, e homogeneizada com baqueta de vidro. Logo após, as amostras permaneceram em estufa de ventilação de ar forçado por 24 horas, sendo então inseridas diretamente no forno mufla. Seguidamente, foram adicionados 2 mL de HNO_3 6 mol L^{-1} às amostras, as quais permaneceram em chapa aquecedora à temperatura de 200 °C até completa evaporação da fase aquosa. Logo após a evaporação, metade das amostras (arroz 1) foram novamente inseridas na mufla sendo submetidas pela segunda vez à mesma programação, e as demais amostras (arroz 2), após a evaporação, tiveram adição de 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1} até início da ebulição. Seu conteúdo foi transferido para balões de 25 mL e avolumado com água desionizada. As amostras, ao serem retiradas da mufla pela segunda vez, foram deixadas em chapa aquecedora após a adição de 5 mL HNO_3 2 mol L^{-1} até que ocorresse a dissolução das cinzas (em alguns casos foi necessário utilizar o banho de ultrassom). As

amostras, ao serem retiradas da mufla foram transferidas para balões de 25 mL e avolumadas com água desionizada.

No oitavo ensaio, experimentou-se com os vegetais a metodologia de preparo para determinação de Cd e Pb em tecido animal realizada na rotina do setor de Contaminantes Inorgânicos do Lanagro-SP. Pesaram-se 3 g de amostra, adicionando-se 750 µL de modificador químico $Mg(NO_3)_2$ 6,67%, sendo as amostras então secas em estufa por período de 48 horas. Ao saírem da estufa foram inseridas diretamente na mufla. Após a primeira etapa da calcinação, foi realizada a adição de 2 mL de HNO_3 50% v/v nas amostras, as quais foram mantidas em chapa aquecedora até completa evaporação da fase aquosa. Seguidamente, foram levadas novamente à calcinação em mesma programação de aquecimento. Após dissolução das cinzas com auxílio de HNO_3 5% v/v, as amostras foram transferidas para balão de 25 mL e avolumadas com o mesmo ácido.

O nono ensaio consistiu na pesagem de 2 g de amostra e repetição dos procedimentos do oitavo ensaio, porém com antiga programação de aquecimento (160 °C por 1 hora e 500 °C por 2,5 horas).

As fortificações sempre foram realizadas logo após a pesagem das amostras em cadinhos de porcelana. Além destes, denominados recuperados, sempre foi incluído em cada batelada um cadinho contendo apenas reagentes e água desionizada (branco de reagente), e pelo menos dois cadinhos contendo apenas amostras sem adição de padrão (brancos de amostra).

3.2.2 Otimização do preparo via úmida fechada (forno micro-ondas)

As otimizações das digestões por via úmida fechada foram realizadas em microondas (modelo Microwave 3000, marca Anton Paar) a partir de muitas modificações da programação utilizada por Zhao et al. (2004).

Foram realizados vários testes para a digestão em micro-ondas dos cereais, oleaginosas e alface no rotor de 8 e 16 posições para vasos de reação. Houve esforço em otimizar única programação para cada um dos grupos a fim de simplificar a rotina de análises. No decorrer das digestões foram modificados os seguintes parâmetros: massa a ser digerida, temperatura e pressão, tempo final de programação e reagentes a serem utilizados. Os resultados podem ser visualizados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Testes de digestão realizados em forno micro-ondas com amostras de trigo

Dig.	Temp. (ºC)	Pres. (bar)	Massa (g)	Tempo	Resultado*	Observações
1	211	42,7	0,3	00:28:00	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
2	205	37	0,3	00:23:00	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
3	148	24,4	0,3	00:18:00	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
4	146	22,9	0,5	00:18:00	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
5	141	18,6	0,5	00:15:30	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
6	125	13,9	0,5	00:14:00	Não Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
7	139	17,5	0,5	00:15:45	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
8	160	24,4	0,5	00:16:30	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
9	164	23,3	0,7	00:16:00	Conforme	HNO_3 (4 mL) e H_2O_2 (2 mL), rotor 8
10	148	21,6	0,5	00:18:00	Conforme	HNO_3 (6 mL), rotor 8
11	124	23,7	0,7	00:16:30	Conforme	HNO_3 (6 mL), rotor 8
12	153	33,6	0,7	00:25:00	Conforme	HNO_3 (6 mL) (4 etapas), rotor 8
13	152	30,6	0,7	00:21:00	Conforme	HNO_3 (6 mL) (4 etapas), rotor 8
14	108	< 40	0,7	00:21:00	Conforme	HNO_3 (6 mL) (4 etapas); rotor de **16**
15	149	< 40	0,7	00:21:00	Conforme	HNO_3 (6 mL) (4 etapas); rotor de **16**

Dig. – ordem dos experimentos realizados;
Temp. – temperatura máxima atingida durante a programação;
Pres. – pressão máxima atingida durante a programação;
Tempo – minutos e segundos totais da programação;
*visualização do aspecto da digestão da amostra;

Inicialmente os testes foram realizados com a matriz trigo com massa de 0,3 g para verificação do comportamento do microondas. A partir disso, muitos experimentos foram realizados para determinação do método final. A tabela 3.2 demonstra resumidamente a sequência de experimentos realizados na etapa de otimização para a digestão em micro-ondas. O método final consiste na pesagem de 0,7 g de amostra em balança de precisão (modelo AY220, marca Shimadzu) diretamente em tubos teflon e adição de 6 mL de ácido nítrico 65% m/m destilado (marca Merck), empregando o rotor de 16 vasos de reação. Após a digestão, as amostras foram transferidas para balões de 25 mL e avolumadas com água desionizada, sendo então encaminhadas para leitura.

Em cada ensaio foram utilizados tubos contendo amostras fortificadas (denominadas recuperados) com 140 µL de solução de Cd 1µg mL^{-1} (marca VHG LABS, concentração da solução estoque 1000mg L^{-1}). A fortificação foi realizada logo após a pesagem. Além dos recuperados, sempre foi incluído em cada rodada um tubo contendo apenas reagente e água deionizada (branco de reagente), e dois tubos com amostras sem adição de padrão (brancos de amostra).

Após prévio estabelecimento do protocolo de digestão para trigo, o mesmo foi aplicado às amostras de milho e arroz apresentando excelentes resultados de recuperação, sendo então adotado para todos os cereais (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Programação final do forno micro-ondas para amostras de cereais

Potência (W)	**Rampa**	**Tempo de permanência**
130	00:30	03:00
250	00:30	04:00
430	00:30	07:00
550	00:30	05:00

A mesma série de experimentos foi realizada com as matrizes soja, feijão (Tabela 3.4) e alface (Tabela 3.5) para obtenção da programação adequada de digestão. O método final para as três matrizes consiste na pesagem de 0,5 g de amostra seca, moída a tamanho de partícula ≤ 500µm, seguidamente de adição de 140 µL de solução padrão de Cd 1 µg mL^{-1} (VHG LABS, concentração da solução estoque de 1000mg L^{-1}) e 6 mL de HNO_3 65% m/m destilado. Após a digestão, as amostras foram transferidas para balões de 25 mL e avolumadas com água desionizada, sendo então encaminhadas para leitura.

Tabela 3.4 – Programação do forno micro-ondas para amostras de soja e feijão

Potência (W)	**Rampa**	**Tempo de permanência**
300	00:30	03:00
500	00:30	04:00
900	00:30	07:00
1200	00:30	05:00

Tabela 3.5 – Programação do forno micro-ondas para amostras de alface

Potência (W)	Rampa	Tempo de rampa
150	00:30	03:00
300	00:30	03:00
450	00:30	06:00
600	00:30	05:00

3.2.3 Otimização do preparo de amostras por suspensão

Na tabela 3.6 estão dispostos os principais ensaios promovidos durante o período de otimização do método, os quais serão descritos a seguir.

Tabela 3.6 – Resumo com os principais ensaios realizados durante o período de otimização do método de preparo de amostras na forma de suspensão

Ensaios	Massa	Reagentes	Volume	Observações
1°	3 g	TMAH	6 mL	N.A.
*2°	3 g	TMAH TMAH + Triton X-100 TMAH + Triton X-100 + EDTA	6 mL 6 mL + 62,5 µL 6 mL + 62 µL + 625 µL	Aquecimento a 75 °C/ Sem adição de Cd
3°	0,5 g	HNO_3 TMAH + Amilase	0,5 mL 1 mL + 2 mL	Sem adição de Cd
4°	0,5 g	Amilase + HNO_3	2 mL + 0,5 mL	Sem adição de Cd
5°	3 g	HNO_3	2,5 mL	N.A.
6°	0,5 g	HNO_3 + Triton X-100 HCl + Triton X-100 HCl + HNO_3 Amilase + HCl	0,5 mL + 200µL 100 µL + 200 µL 100 µL + 0,5 mL 1 mL + 100 µL	Sem adição de Cd
7°	3 g	HNO_3	2,5 mL	N.A.

A figura 3.1 apresenta a imagem de uma suspensão com amostra de soja antes e após ser submetida ao processo de centrifugação.
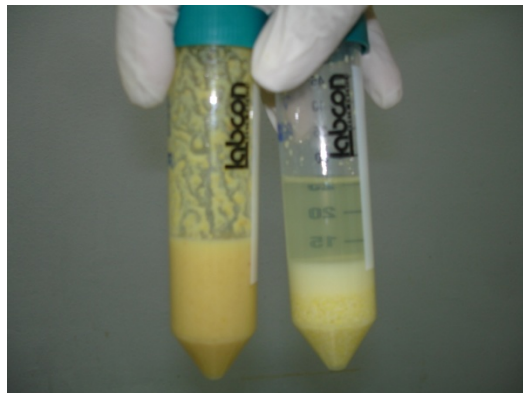
Figura 3.1 – Suspensão com soja antes e depois do processo de centrifugação

Os primeiros ensaios com suspensão foram realizados utilizando hidróxido de tetrametilamônio ($(CH_3)_4N(OH)$) (TMAH) como solubilizador para todas as amostras. No primeiro ensaio, foram pesados aproximadamente 3 g de todas as amostras em tubos cilíndricos de polipropileno (PP, marca Labcon) com capacidade de 50 mL. Após a pesagem, as alíquotas foram umedecidas com água desionizada, fortificadas com padrão de Cd e então, adicionou-se 6 mL de TMAH (concentração 25% m/m em metanol, marca Sigma-Aldrich). O segundo ensaio foi baseado no trabalho de Nunes (2009) com modificações. Procedeu-se teste simultâneo com três tratamentos envolvendo apenas a matriz arroz. Foram pesadas alíquotas de 3 g de amostra em tubos PP de 50 mL, as mesmas foram fortificadas com padrão de Cd e umedecidas com água desionizada. O tratamento 1 consistiu de adição de apenas 6 mL de TMAH (25% m/m); no segundo tratamento adicionou-se 6 mL de TMAH (25% m/m), 62,5 µL de Triton X-100 (10% m/v); no terceiro tratamento adicionaram-se 6 mL de TMAH, 62,5 µL de Triton X-100 (10% m/v) e 625 µL de EDTA (10% m/v) todas as amostras foram aquecidas simultaneamente em banho maria à temperatura de 75 °C (Miller-Ihli, 1988), e mantidas por pelo menos 30 minutos nesta condição.

No terceiro, também com arroz, experimento foi pesado 0,5 g de amostra em tubos PP de 15 mL para mais dois novos tratamentos sendo o primeiro com adição 2 mL de enzima amilase (Alfha Amylase, marca Tecnoglobo) e após 20 minutos acrescentou-se 1 mL de TMAH (25% m/m); no segundo tratamento, após o umedecimento das amostras com água desionizada, foi

realizado com adição 0,5 mL de HNO_3 destilado 65% m/m sendo as amostras sonicadas em banho de ultrassom (modelo PC 620, marca Branson) por 30 minutos. Após a sonicação procedeu-se a centrifugação das amostras por 20 minutos em centrífuga (marca Gerber Instruments) a 1020 rpm, para posterior análise do sobrenadante.

No quarto ensaio foi testado em amostras de alface e arroz a combinação de amilase com HNO_3. Pesou-se 0,5 g de amostra em tubos de PP de 15 mL, adicionando-se 2 mL de amilase e 0,5 mL de HNO_3 destilado concentrado. No quinto ensaio desenvolveu-se, com modificações, protocolo de Silva et al. (2003) apenas com feijão, porque dentre todas as seis matrizes testadas, as leguminosas foram as que apresentaram maior dificuldade de manuseio. Pesaram-se 3 g de amostra em tubo de PP de 50 mL, sendo as amostras umedecidas com água desionizada, fortificadas com padrão de Cd e posterior adição de 2,5 mL de HNO_3 destilado 65% m/m (concentração final 1,4 mol L^{-1}).

No sexto ensaio foram testados quatro tratamentos em matrizes de feijão e alface. Foram pesados 0,5 g de amostra com adição de 200 µL de Triton X-100 (10% m/v) e 0,5 mL de HNO_3; 200 µL de Triton X-100 (10% m/v) e 100 µL de HCl; 100 µL de HCl + 0,5 mL de HNO_3; e 1 mL de enzima amilase + 100 µL de HCl. Todos os tratamentos foram mantidos em banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugados por 20 minutos a 1020 rpm. No sétimo ensaio foram repetidas as condições do experimento cinco para todas as matrizes para confirmação do método.

Em cada ensaio foram utilizados tubos de PP contendo amostras fortificadas com solução de Cd 1µg mL^{-1} (marca VHG LABS, concentração da solução estoque 1000 mg L^{-1}). A fortificação foi realizada logo após a pesagem, sendo incluído em cada rodada um tubo contendo apenas reagente e água desionizada (branco de reagente), e dois tubos com amostras sem adição de padrão (brancos de amostra). O preparo das amostras sempre foi realizado em duplicata.

Após estabelecimento do método, a etapa seguinte foi otimizar as temperaturas de pirólise e atomização para leitura das suspensões, pois até o momento todas as amostras estavam sendo lidas segundo as condições estabelecidas para amostras de carne do Lanagro-SP (300 °C e 1500 °C) provenientes de digestão em mufla. Neste estudo utilizou-se padrão de Cd com concentração de 5 µg/L e suspensões com amostras de alface, arroz e soja com aproximadamente a mesma concentração do padrão. Oito temperaturas foram testadas na etapa de pirólise sendo a inicial 300 °C, com aumentos gradativos a cada 100 °C, e final 1000 °C. Na etapa de atomização foram testadas onze temperaturas, sendo a inicial de 1100 °C, com aumentos gradativos a cada 50 °C, e

final 1600 °C. Durante as variações na pirólise a temperatura de atomização foi fixada em 1300 °C e durante a etapa de atomização a pirólise foi fixada em 550 °C. Este processo de fixação de temperatura em dada etapa também foi o procedimento utilizado por Zhang et al (2005). As temperaturas escolhidas neste estudo foram fundamentadas para que englobassem as condições utilizadas nas determinações de Cd nas amostras de carne do Lanagro-SP (condições utilizadas até o momento).

Seguidamente a esta investigação, foi realizado experimento para estudo da capacidade do método em manter desemopenho na determinação de Cd frente a grandes alterações em seus procedimentos, trata-se da robustez do método. O ensaio foi desenvolvido por meio da abordagem de Youden de acordo com exigência da Decisão (CE) 657/2002 e DOQ-CGCRE-8 do INMETRO. Este teste condiz estudo de variação em 7 parâmetros com apenas 8 ensaios, trata-se de um planejamento fatorial fracionário de 2^{7-4} experimentos. Além de avaliar a robustez do método, também é possível ordenar a influência da variação de cada um dos fatores alterados. Para este procedimento foi utilizada a matriz alface com fortificação de Cd em nível do TMC, sendo cada experimento realizado em duplicata (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Parâmetros do método de suspensão e suas respectivas variações para teste de robustez

Parâmetro	**Nominal**		**Variação**	
Massa de amostra	0,5 g	(A)	1,0 g	(a)
Tamanho de partícula	500 µm	(B)	1000 µm	(b)
Volume de HNO_3	2,5 mL (10% v/v)	(C)	2,0 mL (8% v/v)	(c)
Tempo de Sonicação	30 min	(D)	20 min	(d)
Aquecimento	25 °C	(E)	75 °C	(e)
Tempo de reação do HNO_3	18 horas	(F)	2 horas	(f)
Tempo de Centrifugação	20 min	(G)	10 min	(g)

As letras maiúsculas são os parâmetros estipulados para o método sendo as minúsculas a variação proposta. Na tabela 3.8 estão dispostas as combinações realizadas em cada experimento. Juntamente com as 16 amostras fortificadas foram preparados dois brancos de amostra e um branco de reagente.

Tabela 3.8 – Combinações utilizadas no ensaio de robustez do método de suspensão para vegetais

Valor do Fator F	**Combinações dos fatores e suas variações**							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	*S*	*T*	*U*	*V*	*W*	*X*	*Y*	*Z*

As leituras foram realizadas de modo aleatório, no mesmo dia com uma única curva de calibração, sendo os resultados corrigidos para a massa fresca.

3.2.4 Leitura em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS)

As determinações do analito Cd foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Figura 3.2) (modelos AAnalyst 800 e AAnalyst 600, marca Perkin Elmer) equipado com amostrador automático (AS 800 autosampler), plataforma de L'vov, tubo recoberto com grafite pirolítico e efeito Zeeman de correção de fundo. A fonte de radiação provém de lâmpada de descarga sem eletrodo com corrente de 0,8 mA e fenda de 0,7 nm.

A programação do espectrômetro, e os parâmetros instrumentais para a determinação de Cd durante o período de otimização dos métodos descritos anteriormente estão descritos nas tabelas 3.9 e 3.10. Estas condições são utilizadas pelo laboratório Lanagro-SP nas determinações de rotina de Cd para as variadas amostras de carne. Condições específicas para amostras vegetais foram otimizadas durante o desenvolvimento do método.

Figura 3.2 – Espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) AAnalyst 800

Tabela 3.9 – Programação do GF AAS utilizado nas determinações de Cd (amostras de carne)

	Temperatura (ºC)	**Rampa (s/ ºC)**	**Tempo de espera (s)**	**Gás Argônio mL min^{-1}**
Secagem	110	1	30	250
	130	5	30	250
Pirólise	300	10	20	250
Atomização	1500	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

Para realização das leituras utilizou-se HNO_3 0,2% (v/v) como diluente para preparo das soluções padrões (quando necessário) e modificadores de químicos em solução inseridos juntamente com as amostras. Foram utilizadas as concentrações de 1 mg mL^{-1} de nitrato de magnésio ($Mg(NO_3)_2$) (marca Perkin Elmer Precisely concentração estoque 1000 mg L^{-1}) e de 10 mg mL^{-1} de fosfato de amônio ($NH_4H_2PO_4$) (marca Perkin Elmer Pure, concentração estoque 10%).

Tabela 3.10 – Parâmetros e soluções para determinação de Cd em GF AAS

Parâmetros	Cádmio
Comprimento de onda	228 nm
Solução diluente	HNO_3 0,2 % (v/v)
Solução padrão	10 µg L $^{-1}$
Solução de modificador químico	3,0 µg de $Mg(NO_3)_2$ 50,0 µg de $NH_4H_2PO_4$
Curva analítica	1,0 - 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 - 10,0 µg L $^{-1}$ (a partir da solução padrão 10 µg L $^{-1}$, com diluição realizada pelo equipamento)
Solução padrão de verificação	5,0 µg L $^{-1}$

Para cálculo das concentrações de Cd foi utilizada a seguinte eq. (1):

$$\text{Conc.}(\mu g\ kg^{-1}) = \frac{\text{leitura } (\mu g\ L^{-1}) \times \text{vol. balão (mL)} \times \text{diluição}}{\text{Massa da amostra (g)}} \qquad (1)$$

A concentração foi obtida pela absorvância integrada no tempo, o que segundo Miller-Ihli (1988) culmina em resultados mais acurados que os baseados em altura do pico.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Calcinação

Foram dirigidos esforços para que todas as matrizes pudessem ser mineralizadas pelo mesmo método, logo bons resultados com poucas matrizes não foram interessantes ao laboratório, visto a intensidade das análises de rotina do mesmo.

Os resultados obtidos com os experimentos de mufla (Gráfico 3.1 e Tabelas 3.11 e 3.12) foram considerados insatisfatórios, pois os métodos desenvolvidos no Lanagro-SP devem ser capazes de obter recuperações na faixa entre 70% a 110% com coeficientes de variação entre replicatas abaixo de 10% para assim satisfazer as exigências da Decisão (CE) 657/2002, sendo estes valores independentes da matriz em questão ou do TMC do analito.
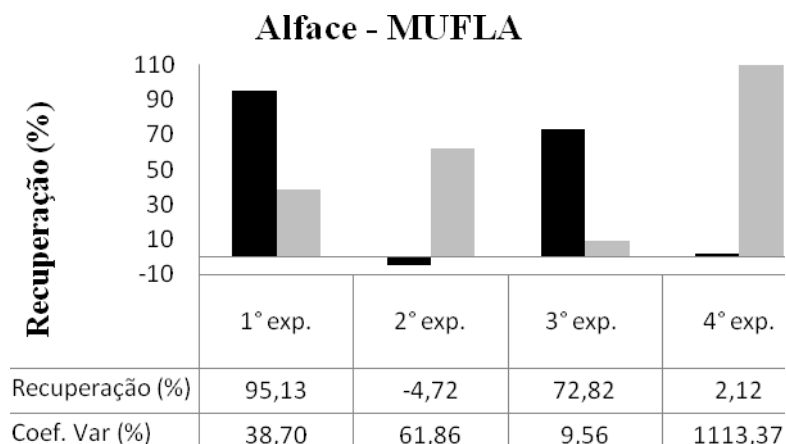
Gráfico 3.1 – Resultados das digestões da matriz alface em mufla

Tabela 3.11 – Digestões em mufla das matrizes soja e feijão

Experimento	Matriz	Recuperação (%)	Desvio-Padrão (%)	C.V. (%)
1°	Soja	50,59	15,63	30,90
2°	Soja	1,86	8,03	430,88
	Feijão	-4,22	6,70	-158,88
3°	Soja	87,10	6,89	7,91
	Feijão	86,59	2,25	2,60
4°	Soja	111,52	53,98	48,41

C.V. = coeficiente de variação.

Jorhem (1995) comenta que baixas recuperações em análises de calcinação podem advir de falta de controle e/ou elevação rápida de temperatura dentro da mufla, utilização de temperaturas finais altas para oxidação, combustão incompleta das amostras e perdas durante a filtração. Segundo Wu et al. (1997) as análises em mufla comumente estão susceptíveis a contaminação e principalmente perdas de analitos mais voláteis, culminando em baixas recuperações.

A taxa de aumento de temperatura do forno mufla utilizado em todos os experimentos foi de 10°C/hora, estando abaixo do considerado prejudicial 50°C/hora (JORHEM, 1995). Segundo este autor, esta taxa de elevação causa pontos singulares de alto calor na amostra ou até mesmo ultrapassagem da temperatura máxima requerida. Além da taxa de elevação, exposição das amostras por tempo prolongado a altas temperaturas pode causar volatilização de analito, porém, neste trabalho foi testado menor tempo de exposição das amostras à calcinação, o que não

modificou as baixas recuperações. Estes dados vão de encontro com os citados por Hoening et al. (1998) que comentam inexistência ou perdas mínimas de Cd por volatilização em amostras vegetais em temperaturas próximas a 450 °C.

Tabela 3.12 – Digestões em mufla das matrizes arroz, trigo e milho para determinação de Cd

Experimento	Matriz	Recuperação (%)	Desvio-Padrão (%)	C.V. (%)
1°	Arroz	31,36	3,45	11,00
	Trigo	82,02	1,18	1,43
	Milho	60,90	13,25	21,76
3°	Arroz	64,36	21,25	33,01
	Trigo	68,89	7,19	10,44
	Milho	96,70	16,92	17,5
5°	Arroz ***A***	75,95	88,78	116,89
	Arroz ***B***	24,66	20,29	82,27
6°	Arroz	24,67	7,43	30,11
7°	Arroz ***1***	33,88	1,77	5,22
	Arroz ***2***	26,29	2,16	8,22
8°	Arroz	82,3	5,97	7,26
9°	Arroz	66,37	149,71	225,57

C.V. = coeficiente de variação

A ocorrência de queima incompleta das amostras pode gerar baixas recuperações por impedir a liberação dos analitos na solução ácida proveniente das cinzas. Esta hipótese foi mencionada pelo fato das cinzas obtidas com apenas uma rampa de aquecimento terem se apresentado escuras e de difícil solubilização, porém este fato tornou-se pouco plausível visto que nos experimentos 6 e 7 com três rampas de aquecimento e duas etapas de calcinação (cinzas de coloração branca), obteve-se as menores recuperações de arroz dentre todos os ensaios com mufla.

Embora tenha sido inserida mais uma rampa de temperatura para tornar menos ab-rupta a calcinação, esta medida não melhorou as recuperações das matrizes em que foi testada ao passo que gerou recuperações negativas. Este perfil de recuperação pode ocorrer quando a amostra

branca apresenta teor do elemento mais alto que as amostras fortificadas mascarando a presença do analito adicionado (quando este é adicionado em baixa concentração). Porém os resultados dos brancos de amostra mostraram-se baixos, evidenciando a perda do analito adicionado em algum ponto do processo de preparo da amostra.

Aparentemente o HNO_3 gerou melhores resultados que o HCl por ser excelente agente oxidante para amostras biológicas (HOENIG et al., 1998). Outro fator de decisão foi que o HNO_3 faz parte da rotina do laboratório funcionando adequadamente para amostras de tecido animal, logo instigou-se a curiosidade de teste em amostras vegetais.

Visando melhor análise dos resultados decidiu-se trabalhar com apenas uma matriz para que desta forma fosse possível comparar os próximos resultados com os já obtidos. O arroz foi a matriz de eleição devido à grande quantidade de amostra prontamente preparada para análise.

Na tabela 3.12 pode-se perceber melhora na recuperação de arroz utilizando modificador químico (arroz A). Isso se deve ao fato dos modificadores químicos aumentarem a estabilidade térmica do analito, além de minimizar os efeitos da matriz e sinais de fundo. Porém o alto coeficiente de variação entre as replicatas sugere que o método não foi reprodutivo.

A publicação de Jorhem (1995) comenta que os resultados são influenciados por erros associados aos ensaios, erros estes que poderiam ser evitados por meio de implantação efetiva de sistema de gestão da qualidade no laboratório, porém essa possibilidade não se aplica ao presente trabalho, visto que a unidade de Contaminantes Inorgânicos no Lanagro-SP segue a ABNT NBR ISO/IEC 17025, participa de ensaios de proficiência com amostras nacionais e internacionais e possui certificado de acreditação do INMETRO segundo a referida norma.

Grande fonte de erro em análises utilizando mufla é a contaminação do ar (Jorhem, 1995). Este fato parece não ter ocorrido neste trabalho, pois as baixas recuperações evidenciam perdas de analito e não foi observada contaminação dos brancos de amostra e brancos de reagente, demonstrando que o ambiente em que a técnica foi trabalhada é adequado para determinação de Cd.

Possível causa do insucesso da mufla pode ser o teor de silício nos grãos. Hoening et al. (1998) comentam que este elemento está presente no tecido animal em quantidades traços, porém nas plantas pode chegar a 10% do teor de cinzas estando principalmente sob a forma de colóides, logo a mineralização das amostras vegetais por este método deva ser mais agressiva com utilização de reagentes como HF, ou seja, calcinação apenas com HNO_3 ou HCl não é suficiente

para desestruturar os componentes contendo sílica. No entanto o laboratório não tem interesse em trabalhar com este reagente devido ao perigo que oferece aos analistas. Logo há possibilidade de que duas calcinações não sejam capazes de liberar o Cd da matriz, e possivelmente o adicionado que sofre adsorção aos resíduos de sílica remanescentes. Estes autores relatam resultado de experimento (450 °C) com matrizes vegetais em que o arroz apresentou maior quantidade de resíduo insolúvel (11,3%), sendo também o grão que mais possui sílica.

De forma abrangente, todos os experimentos conduzidos em mufla não geraram resultados satisfatórios o que resultou em abandono da técnica para decomposição de amostras vegetais.

3.3.2 Digestão via úmida em forno micro-ondas

As condições ótimas de funcionamento do micro-ondas não dependem apenas da matriz e massa de amostra utilizadas, mas também da natureza e volume de reagentes utilizados, temperatura e tempo de reação (HOENING et al., 1998), logo todos estes parâmetros foram testados com objetivo de obter melhor desempenho de programação.

Durante os experimentos de 1 a 10, as otimizações buscaram obter soluções de amostra sem resquícios de material sólido ao fundo dos tubos teflon, sendo esta decisão tomada a partir da observação a olho nu do material digerido. De posse de observação positiva foram realizadas as determinações em GF AAS.

O forno micro-ondas utilizado possibilita otimizar as programações por meio da potência ou temperatura. Assim como nos trabalhos de Jorhem e Engman (2000) e Wu et al. (1997), a otimização dos protocolos testados neste estudo foram em base da potência, pois devido o perfil das amostras (material orgânico) a utilização do parâmetro temperatura oscilava a radiação incidida sobre os vasos de reação culminando em diferenças na eficiência entre digestões.

Wu et al. (1997) encontraram volumes ideais de HNO_3 de 2,5 mL para digestão de grãos e 5,0 mL para folhas em micro-ondas sem a presença de H_2O_2 para 0,5 g de amostra para os dois perfis de matrizes. Neste trabalho, utilizou-se 6 mL para todas as matrizes o que ocasionou aspecto amarelado às soluções digeridas, que segundo o mesmo autor significa decomposição incompleta do material orgânico. Mesmo sob este indício, todas as leituras foram realizadas com solução proveniente de digestão apenas em HNO_3 com obtenção de resultados satisfatórios demonstrando que este parâmetro visual pode não ser bom indicador de recuperação do analito.

O ácido nítrico é o reagente mais utilizado em decomposições de amostras biológicas juntamente com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois este último aumenta o poder de oxidação da amostra (JORHEM e ENGMAN, 2000). Frente a isso, os primeiros experimentos com micro-ondas foram com utilização destes dois reagentes. Wu et al. (1997) trabalharam apenas com HNO_3, pois embora o H_2O_2 tenha melhorado a coloração das soluções digeridas, os autores verificaram, pequeno, grau de contaminação com chumbo por parte do peróxido; visto isso, abandonaram a utilização deste reagente. Verificou-se completa dissolução das amostras de todas as matrizes após a retirada do H_2O_2, sendo que a efetividade da decomposição foi testada em experimentos posteriores (Gráfico 3.2).

Pensou-se em aumentar a quantidade de rampas de aquecimento com diminuição do tempo de duração de cada uma delas, para amenizar o aumento de temperatura e assim prevenir possíveis perdas do analito por volatilização, porém Wu et al. (1997) comentam que não houve diferença de concentração de Cd utilizando apenas uma rampa com testes de duração oscilando entre 10 a 40 minutos.
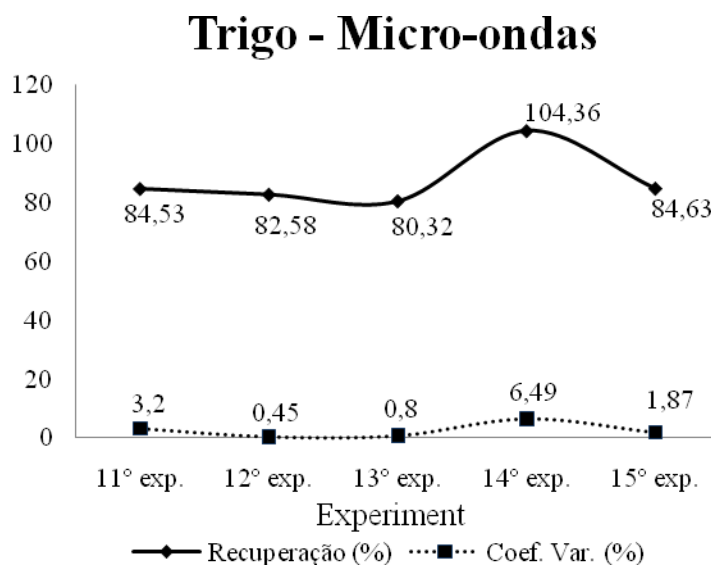
Gráfico 3.2 – Recuperações de Cd em amostras fortificadas de trigo submetidas à digestão em microondas

Tabela 3.13 – Digestões realizadas em forno micro-ondas para mineralização das matrizes vegetais

Matriz	Recuperação (%)	Desvio-padrão (%)	C.V. (%)
Alface	91,57	0,72	0,78
Arroz	82,64	3,38	4,09
Feijão	84,21	2,54	3,02
Milho	83,69	3,92	4,68
Soja	87,5	5,11	5,83

* Resultados em base de matéria seca.
C.V. = coeficiente de variação.

As recuperações dos grãos permaneceram aproximadamente em 80% (Tabela 3.13) provavelmente devido à existência de substâncias com sílica que, segundo a literatura, tem sua decomposição incompleta apenas com a presença de HNO_3 (WU et al., 1997). Logo, essa decomposição incompleta pode reduzir as recuperações devido a adsorção do analito adicionado à amostra.

Embora a técnica por forno micro-ondas tenha gerado resultados acima de 80% de recuperação, a mesma não foi passível de ser validada devido à baixa capacidade de massa de amostra por tubo que pode ser processada. Autores como Jorhem e Engman (2000) não recomendam inserir em micro-ondas massas acima de 0,5 g de matéria seca. Informação esta que solidifica a escolha de massa menor que 1,0 g de amostra para todas as matrizes. Porém, esta quantidade máxima de massa não incita concentração de 1 $\mu g\ L^{-1}$ (primeiro ponto da curva analítica) na faixa de adição em 20% do TMC, um requisito de validação estabelecido pelo Regulamento (CE) 333/2007, legislação da Comunidade Européia específica para contaminantes inorgânicos.

3.3.3 Suspensão

Não é necessário utilizar alíquota da suspensão como um todo, pode-se analisar apenas o sobrenadante da mesma, ao passo que a determinação do analito pelos dois métodos pode ser equivalente (CAPELO et al., 1998). Sob esta premissa, todas as análises foram realizadas apenas com o sobrenadante das suspensões obtido após centrifugação das amostras. Esta técnica elimina

a preocupação com obtenção de tamanho reduzido de partícula e minimiza sinais de fundo (WIBETOE et al., 1999; MINAMI et al., 1996).

Na tabela 3.14, os experimentos de 1 a 4 não foram submetidos a determinação no ETAAS, pois o estado físico das amostras impossibilitou sua leitura. Logo após a adição do TMAH, em segundos as amostras adquiriram aspecto gelatinoso o que consequentemente dificultou sua homogeneização nos tubos de PP e fortificação com o padrão, o que outrossim, obstou a aquisição de fase líquida para inserção no espectrômetro. Acredita-se que esta gelatinização seja por reação entre os grumos de amido e a base forte (este comportamento não foi observado em amostras de alface). Por isso testou-se em alguns experimentos seguintes digestão prévia do amido com amilase, porém sem sucesso. Silva et al. (2003) também trabalhando com TMAH em amostras vegetais constataram que este reagente não resultou em completa dissolução ou solubilização das amostras.

Tabela 3.14 – Resultados das recuperações de Cd pelo método de suspensão em matrizes vegetais fortificadas

Exp.	Matriz	Rec.(%)	Desvio-Padrão (%)	C.V. (%)
1°	Todas as matrizes	*	*	*
2°	Arroz	*	*	*
3°	Arroz	*	*	*
4°	Arroz	*	*	*
5°	Arroz	84,91	1,66	1,95
6°	Feijão (HNO_3/ Triton)	-6,73	9,51	141,42
	Feijão (HCl/ Triton)	-3,23	0,05	1,58
	Feijão (HCl/ HNO_3)	-3,17	0,05	1,60
	Feijão (Amilase/ HNO_3)	73,84	19,08	25,84
7°	Arroz	91,29	3,48	3,82
	Feijão	92,40	2,43	2,63
	Milho	93,75	0,19	0,21
	Soja	101,71	1,47	1,45
	Trigo	92,28	1,05	1,14

* Amostras que não foram conduzidas à quantificação em AAS.
C.V. = coeficiente de variação.

Os resultados promissores com HNO_3 do experimento 5 (Tabela 3.14) já eram esperados visto que a literatura indica este ácido como excelente agente oxidante em suspensões tanto para amostras orgânicas como inorgânicas (HOENIG et al., 1998; MILLER-IHLI, 1988; ACAR, 2005).

Mesmo com este bom resultado, tentou-se melhorar o desempenho da suspensão ácida com a utilização de agente estabilizante Triton X-100 que, segundo Acar (2005), é um dos estabilizantes mais utilizados no preparo de suspensões. Os gráficos no anexo 1 originados pelo sinal de absorvância e o fundo resultantes destes tratamentos demonstram o insucesso de extração do analito. Viñas et al. (1993) não obtiveram sucesso de estabilidade e altos valores de fundo com a utilização de Triton X-100 e outros agentes estabilizantes em suspensão com folhas de feijão, mesmo fato observado neste trabalho com folhas de alface. Frente a estes resultados e os relatos na literatura (MINAMI et al., 1996; CAPELO et al., 1998; WIBETOE et al., 1999) sobre não haver necessidade de utilização de agentes estabilizantes para análise de sobrenadante, optou-se por abandonar sua utilização.

O experimento 7 na tabela 3.14 corrobora com a pesquisa de Viñas et al. (1993) que também obtiveram excelentes resultados em suspensões vegetais (acima de 80% de recuperação) utilizando apenas HNO_3. Os mesmos afirmam que o ácido extrai parcial porção do analito para a fase aquosa da suspensão. A média de recuperação abaixo de 100% neste experimento também era esperada visto que é comum o lixiviado ter recuperação menor que a quantidade total de metal existente na amostra (AFRIDI et al., 2007).

Após a escolha pela suspensão ácida, várias matrizes de soja e milho foram analisadas conjuntamente por preparo em suspensão e forno micro-ondas como meio de verificar os resultados obtidos pelas suspensões. Devido à proximidade de resultados, pôde-se obter indicação sobre a adequação do método por suspensão ao objetivo pretendido. Assim como no presente estudo, Baralkiewicz et al. (2010) não encontraram diferença entre os métodos de micro-ondas e suspensão na determinação de metais em amostras biológicas. Isso sugere que o perfil de ligações existentes entre o Cd e frações da matéria orgânica não são tão fortes quanto às existentes entre este metal e matrizes inorgânicas (CAPELO et al., 1998).

O passo seguinte no desenvolvimento do método foi a otimização das temperaturas de pirólise e atomização, as quais foram escolhidas de acordo com o a área e o perfil do pico gerado pelo sinal da absorvância e verificação da queda de sinal do analito (Gráfico 3.3).
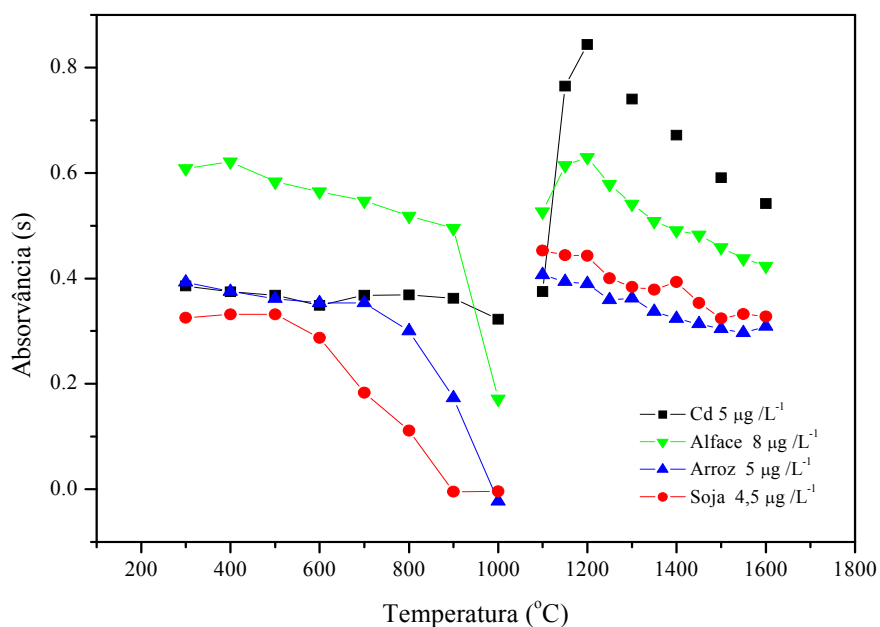
Gráfico 3.3 – Otimização das temperaturas de pirólise e atomização de matrizes representantes de oleaginosas, cereais e vegetais folhosos para determinação de Cd em suspensão ácida pelo método ETAAS

Por meio do gráfico 3.3 pode-se verificar que o comportamento entre as suspensões e a solução padrão foi similar, o que facilitou realizar a construção da curva analítica com utilização de solução padrão ao invés de amostras reais (curva matriz). Mesma verificação foi relatada no trabalho de Capelo et al. (1998). Isto sugere baixa interferência de matriz neste método, sendo este indicativo extensivamente analisado durante a etapa de validação do método.

Lima et al. (2000) observou que há menor inserção de material orgânico dentro do atomizador quando analisa-se apenas o sobrenadante, diminuindo a formação de resíduos carbonados e minimizando as perdas de analito na fase de condensação antes da atomização. Aliado a isso, quanto maior a temperatura de pirólise possível, mais reduz-se as possíveis interferências e sinais de fundo. Logo, escolheu-se a maior temperatura com menor queda de sinal (Tabela 3.15), estando a mesma em acordo com a encontrada por Minami et al. (1996) para determinação de Cd em amostras biológicas utilizando apenas o sobrenadante da suspensão. Acar (2005) cita autores que, utilizando modificadores químicos, como é o caso deste trabalho, alcançaram temperatura de pirólise para Cd de 500 °C sem observações de perda de analito.

A temperatura de atomização também foi selecionada de acordo com o perfil dos sinais de absorvância. O tempo de 5 segundos está de acordo o utilizado por Minami et al. (1996), sendo que este tempo compreende a atomização do elemento e a volta do sinal à linha de base. A grande vantagem para o Lanagro-SP desta programação de temperaturas no GF AAS é o fato de ser a mesma utilizada para suspensões de tecido de peixe, o que facilitará extremamente o trabalho durante a rotina. Porém estas temperaturas serão confirmadas com a leitura de material de referência certificado durante a etapa de validação.

Tabela 3.15 – Programação final do GF AAS utilizado nas determinações de Cd em amostras vegetais pelo método de suspensão

Forno de Grafite				
Cd	**Temperatura (ºC)**	**Rampa (s/ ºC)**	**Tempo de espera (s)**	**Gás Argônio mL min^{-1}**
Secagem	110 130	1 5	30 30	250 250
Pirólise	550	10	20	250
Atomização	1300	0	5	0
Limpeza	2450	1	3	250

Foram estabelecidas duas etapas de secagem (Tabela 3.15), pois segundo Capelo et al. (1998) esse procedimento minimiza possibilidade de borbulhamento da fase líquida da amostra melhorando o sinal de absorção no momento da atomização.

O ensaio de robustez demonstra que apenas a massa de amostra foi fator influente (Gráfico 3.4 e Tabela 3.16) sobre o desempenho do método.
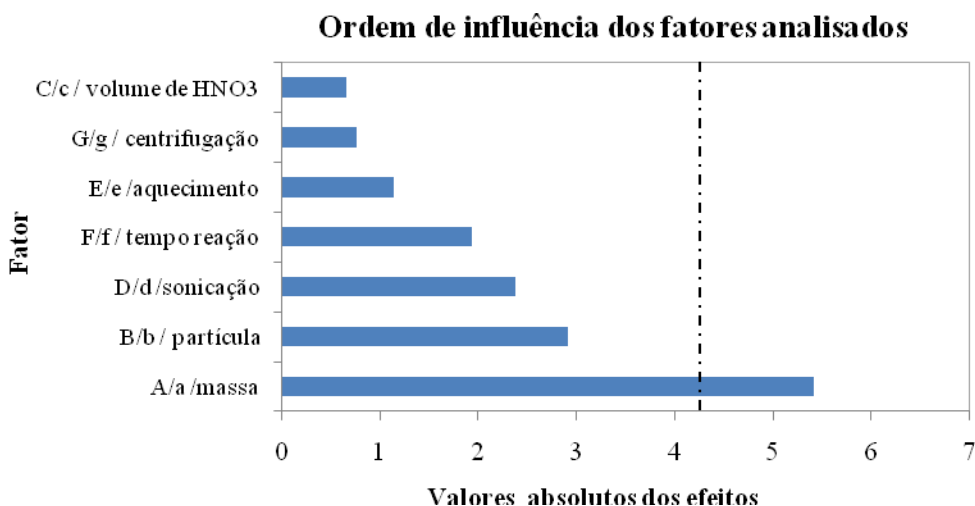
Gráfico 2.4 – Influência da variação de cada fator (em dois níveis) sobre o desempenho da recuperação de Cd em alface

Tabela 3.16 – Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^{7-4} e seus erros padrões (%)

Média global de recuperação	88,50 ± 0,92
Efeitos Principais	**Valores dos efeitos (%)**
A/a/ Quantidade de massa	-5,41* ± 1,84
B/b/ Tamanho de partícula	2,91 ± 1,84
C/c/ Volume de HNO_3	0,66 ± 1,84
D/d/ Tempo de sonicação	-2,38 ± 1,84
E/e/ Aquecimento	1,14 ± 1,84
F/f/ Tempo de reação com HNO_3	-1,94 ± 1,84
G/g/ Tempo de centrifugação	0,76 ± 1,84

$t_{(n=8;\alpha=0,05)}$ = 2,306;
* significativo quando valor absoluto do efeito > (t_8 x *s* (*efeito*));

O aumento de massa melhorou as recuperações de forma significativa (Tabela 3.16). Este resultado discorda de Minami et al. (1996) que encontraram 100% de extração de Cd em amostras biológicas com ensaios variando a massa de amostra entre 2,0 mg a 50 mg. Porém está em acordo com Baralkiewicz et al. (2010), que observaram aumento de concentração do analito determinado a partir do aumento de massa trabalhada. Essa melhora é provavelmente devida ao fato de concentrar o analito na amostra facilitando sua quantificação pelo equipamento.

Segundo Millher-Ihli (1988) há possibilidade de que tamanhos de partícula muito pequenos não sejam necessários para suspensões de amostras biológicas e botânicas, pois são facilmente

destruídas no atomizador. Assim como neste trabalho, Millher-Ihli (1994) não encontrou diferença na precisão de resultados gerados por tamanhos de partícula diferentes. Já Capelo et al. (1998) comenta sobre trabalho cuja a utilização do ultrassom não gerou diferença de recuperação para tamanhos de partícula maiores. Uma desvantagem do processo de moagem é o contratempo de não obtenção de completa homogeneização, ou seja, a fase peneirada pode não representar a amostra como um todo (TOKMAN, 2007). Isso é mais propenso de ocorrência quanto menor o tamanho de partícula requerido, logo é vantajoso conseguir trabalhar com partículas maiores.

Em relação à concentração de HNO_3, ao contrário do apresentado neste estudo, a pesquisa de Viñas et al. (1993) demonstrou aumento da extração de Cd para fase aquosa com aumento de concentração de HNO_3 em suspensão de folhas de feijão, enquanto que, autores como Minami et al. (1996) encontraram extração constante de Cd em concentração de ácido nítrico variando de 0,5 a 2,0 mol L^{-1}. Baralkiewicz et al. (2010) comentam que a extração depende mais do analito em questão e sua interação com a matriz do que com o meio em que a suspensão foi preparada. Provavelmente as concentrações estudadas neste trabalho não foram distintas o suficiente (10% e 8% v/v) para gerar diferenças no desempenho do método.

Já é sabido que a sonicação promove a extração do analito para a solução ácida da suspensão. Embora no presente trabalho não tenha sido observado influência de diferentes tempos em banho ultrassom, sabe-se que a sonicação, por meio da cavitação, forma radicais OH que irão gerar peróxido de hidrogênio, o qual possui propriedade de oxidação quando em meio ácido rompendo aglomerados de partículas melhorando a homogeneização da amostra e consequentemente o contato com o ácido nítrico (ACAR, 2005; CAPELO et al., 1998). Logo, leva-se a considerar que uma vez rompidos os aglomerados não haverá mudanças em deixar a amostra sonicando por mais tempo. Lima et al. (2000) comentam que o Cd parece não estar fortemente ligado às partículas da matriz e seria facilmente extraído para a fase líquida. Os mesmos recomendam que quanto maior o tamanho de partícula trabalhado maior o tempo de sonicação necessário (maiores que 100 μm necessitam de tempo maior que 10 minutos).

Com relação a tempo de reação para extração, o tempo escolhido neste trabalho de duas horas está de acordo com Acar (2005) que exemplifica tempo de reação do ácido nítrico em amostras de plantas variando de algumas horas (2 a 8 horas) até *overnight*. Logo, de acordo com o resultado encontrado no ensaio de robustez escolheu-se otimizar o método com tempo de duas horas de preparo a partir do momento da adição do HNO_3.

O fato do tempo de centrifugação não influenciar significativamente as recuperações, demonstra que após o Cd ter sido extraído da fase sólida para o sobrenadante pode-se realizar a acomodação das partículas ao fundo do tubo PP e trabalhar apenas com a fase líquida sem prejuízo às recuperações. Quanto mais do analito é extraído para a fase líquida mais a precisão irá se aproximar dos resultados obtidos por métodos de digestão convencional (MILLER-IHLI, 1994).

3.4 Conclusão

O método com mufla não gerou resultados satisfatórios em nenhum dos experimentos testados o que culminou no abandono da técnica. Possivelmente a utilização do ácido fluorídrico pudesse gerar perfil de dados diferenciados, porém por decisão da coordenação da unidade de Contaminantes Inorgânicos, o mesmo não foi testado.

As recuperações obtidas com o forno micro-ondas foram satisfatórias no nível de adição de Cd em 100% do TMC, porém devido a sua capacidade limitada de inserção de amostra, adições em 20% do TMC não são capazes de atingir o primeiro ponto da curva analítica (1 $\mu g\ L^{-1}$), logo esta técnica não foi validada.

O método de suspensão foi escolhido para ser validado porque atende a todos os requisitos da Comunidade Européia e INMETRO, além de mostrar-se mais simples, possuir maior velocidade de preparo, economia de reagentes, menor geração de resíduos, possibilidade de análise no GF AAS usando calibração com padrão e menor probabilidade de contaminação.

Referências

ACAR, O. Evaluation of V, Ir, Ru, V-Ir, V-Ru, and W-V as permanent chemical modifiers for the determination of cadmium, lead, and zinc in botanical and biological slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry**. Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 545, p. 244-251, Apr. 2005.

ADAMS, M.L; CHAUDRY, A.M.; ROUSSEAU, I; McGRATH, S. A practical evaluation of microwave and conventional wet digestion techniques for the determination of Cd, Cu And Zn in wheat grain. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry,** Abingdon, v. 83, n. 4, p. 307 – 314, Apr. 2003.

AFRIDI, H.I.; KAZI, T.G.; ARAIN, M.B. JAMALI, M. K.; KAZI, G.H.; JALBANI, N. Determination of cadmium and lead in biological samples by three ultrasonic-based samples treatment procedures followed by electrothermal atomic absorption Spectrometry. **Journal of AOAC International,** Gaithersburg, v. 90, n. 2, p. 470-478, Mar./Apr. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. [s.l.], 2005. 31p.

BARALKIEWICZ, D.; HANC, A.; GRAMOWSKA, H. Simultaneous determination of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in sewage sludge by slurry introduction ICP-OES method. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 90, n. 14, p. 1025 - 1035, 2010.

CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of cadmium from slurried biological samples for electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 13, p. 1285 – 1290, Sept. 1998.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 657/2002, de. Fornece execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 17 de Agosto de 2002, p. 8 - 36.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1881/2006, de 19 de Dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 20 Dezembro. 2006, p. 5 - 24.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 629/2008, de 02 de julho 2008. Altera o Regulamento (CE) nº 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 3 de Julho de 2008. p. 6 – 9.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 333/2007, 28 de março de 2007. Estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 28 de Março de 2007.

FILGUEIRAS, A.V.; CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v.53, n. 2, p. 433-441, Nov. 2000.

HOENIG, M.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJKA, S.; VASSILEVAB, E.: QUEVAUVILLER, Ph. Critical discussion on the need for an eficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 358, n.1, p. 85-94. Jan. 1998.

INMETRO – Orientações sobre validação de métodosanalíticos, DQO-CGCRE-008, Fevereiro de 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2010.

JORHEM, L. Dry ashing, sources of error, and performance evaluation in AAS. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v.119, n 3-4, p. 211-218, 1995.

JORHEM, L; ENGMAN, J. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 83, n. 5, p. 1189-1203, Sept. 2000.

LIMA, E.C.; KRUG, F.J.; FERREIRA, A.T.; BARBOSA JÚNIOR, F. Tungsten-rhodium permanent chemical modifier for cadmium determination in fish slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 14, n.2, p. 269- 274, 1999.

LIMA, E.C.; BARBOSA JR, F.; KRUG, F.G.; SILVA, M.M.; VALE, M.G.R. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 15, n.8, p. 995 - 1000, 2000.

MAGALHÃES, C.E.C.; KRUG, F.J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F.J. **Métodos de preparo de amostras – Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: 1ª ed revisada, 2008. cap. 6.2, p. 191-198.

MAJIDI, V.; HOLCOMBE, J.A. Error analysis for sampling of slurries: sedimentation errors. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Great Britam, v. 45, n. 7, p. 753-761, Jan. 1990.

MAMANI, M.C.V; ALEIXO, L.M; ABREU, M.F; RATH, S. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 709-713, Apr. 2005.

MILLER-IHLI, N.J. Slurry sample preparation for simultaneous multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 3, p. 73-81. Jan. 1988.

MILLER-IHLI, N.J. Automated ultrasonic mixing accessory for slurry sampling into a graphite furnace atomic absorption spectrometer. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 4, p. 295-297, Apr. 1989.

MILLER-IHLI, N.J. Influence of slurry preparation on the accuracy of ultrasonic slurry electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 9, p. 1129-1134, Oct. 1994.

MINAMI, H.; HONJYO, T.; ATSUYA, I. A new solid-liquid extraction sampling technique for direct determination of trace elements in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Great Britam , v. 51, n. 2, p. 211 – 220, 30 Jan. 1996.

SILVA, M. M. et al. Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (Oryza sativa L.) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 377, p. 165 – 172, 2003.

TOKMAN, N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, n. 1/2, p. 87 – 94, 8 May. 2007.

VIÑAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 412, n. 1-2, p. 121-130. 08 May. 2000.

WIBETOE, G.; TAKUWA, D.T.; LUND, W.; SAWULA, G. Coulter particle analysis used for studying the effect of sample treatment in slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 363, n. 1, p. 46 – 54, 1999.

WU, S.; FENG, X.; WITTMEIER, A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 12, p. 797 – 806, Aug. 1997.

ZHAO, F.J. Factors affecting the concentrations of lead in British wheat and barley grain. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p. 461-468. Oct. 2004.

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS VEGETAIS POR GF AAS

Resumo

A validação é ferramenta fundamental na comprovação de que um método analítico é apropriado para o uso pretendido, logo, é desejável que todo método desenvolvido ou não pelo laboratório seja validado previamente a sua utilização. Este trabalho objetivou validar método analítico para determinação do contaminante inorgânico Cd em matriz alface pela técnica espectrometria de absorção atômica com forno de grafite após preparo por suspensão ácida, segundo exigências do INMETRO e Regulamento (CE) 657/2002. A técnica consiste na pesagem de 0,5 g de alface; adição de 2,5 mL de HNO_3 destilado; 20 minutos de sonicação; 2 horas de repouso, 20 minutos de centrifugação e seguidamente completar o volume da amostra para 25,0 mL com água desionizada. As condições para determinação de Cd em espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) foram temperatura de 550 °C para pirólise e 1300 °C para atomização, empregando 3 µg de $Mg(NO_3)_2$ e 50 µg de $NH_4H_2PO_4$ como modificadores químicos em solução. Os parâmetros e métodos para validação foram: linearidade com curva de calibração estabelecida em 1 µg L^{-1}, 2 µg L^{-1}, 4 µg L^{-1}, 6 µg L^{-1}, 8 µg L^{-1} e 10 µg L^{-1} por meio de leitura de 7 replicatas de solução padrão em cada concentração da curva; repetibilidade realizada em dois dias próximos com 7 replicatas de amostra fortificadas com Cd em 100% e 20% do teor máximo do contaminante (1,0 e 0,2 TMC); reprodutibilidade intralaboratorial realizada em dois dias distantes com fortificação de 7 amostras em 1,0 e 0,2 TMC; recuperação (determinada pelos resultados dos experimentos de repetitividade); limite de quantificação (2,5 µg kg^{-1}) e limite de detecção (0,40 µg kg^{-1}) determinados multiplicando-se o desvio-padrão das leituras de amostras brancas (não fortificadas) por 10 e 3 respectivamente; confirmação do L.Q. com leitura de 7 amostras fortificadas no teor do L.Q. a ser confirmado; efeito de matriz por meio de comparação das leituras de solução padrão com solução de amostras fortificadas nos dois níveis do TMC; e extensão de escopo para milho e soja, que embora não seja parâmetro da validação torna-se útil para ampliar a utilização do método. Todas as análises estatísticas basearam-se na verificação da média aritmética, desvio-padrão e coeficiente de variação das leituras entre as replicatas e comparação dos mesmos com os valores permitidos pela legislação. Com exceção da reprodutibilidade, que está parcialmente em andamento, todos os parâmetros experimentais foram considerados conformes com o Regulamento (CE) 657/2002, Regulamento (CE) 333/2007 e DOQ-CGCRE-008 do INMETRO.

Palavras-chave: Cádmio; GF AAS; Suspensão; Validação; Vegetais

Abstract

Validation is an important tool to prove that the method is accepted for the objective proposed, so is interesting that all methods used in a laboratory had been validated before their implementation. The aim of this work was validate a slurry method for Cd determination in lettuce by INMETRO and Commission Decision (CD) 2002/657/EC requirements. The steps of the method were the weighting 0.5 g of lettuce; addition of 2.5 ml of HNO_3 distilled; 20 minutes of sonication; 2 hours of standing and 20 minutes of centrifugation after volume completed for 25 mL with deionized water. The temperature conditions for Cd determination by graphite furnace atomic absorption spectrometer (GF AAS) were pyrolysis temperature of 550 °C and atomization temperature of 1300 °C, using 3 µg of $Mg(NO_3)_2$ e 50 µg of $NH_4H_2PO_4$ as solution chemical modifiers. The parameters and methods to validation were: linearity by calibration curve in 1 µg L^{-1}, 2 µg L^{-1}, 4 µg L^{-1}, 6 µg L^{-1}, 8 µg L^{-1} and 10 µg L^{-1} with 7 solutions standards in each curve's concentration; repeatability did in two closer days with 7 spiked samples with 100% and 20% of the maximum residue limit (1.0 and 0.2 MRL) of Cd; reproducibility was made in two later days with 7 spiked samples in 1.0 and 0.2 MRL; recovery (was evaluated by the results of repeatability); limit of quantification (2,5 µg kg^{-1}) and limit of detection (0,40 µg kg^{-1}) by 10 and 3 times of the standard deviation respectively; confirmation of limit of quantification (LOQ) by 7 spiked samples on LOQ concentration; Matrix effects was evaluated by comparing standard solutions with spiked samples on the two levels of fortification, for this, spiked samples' concentration couldn't be higher than standards concentration; extension of scope for soybean and corn grain was made, although this parameter isn't a validation requirement, to increase the method's applicability. All the statistical analyses were made comparing means, standard deviation and relative standard deviation between samples with the law. Exception of reproducibility, it is still unfinished, all the parameters are in accordance with the Commission Decision (CD) 2002/657/CE and INMETRO.

Keywords: Cadmium; GF AAS; Slurry; Validation; Vegetables

4.1 Introdução

Segundo Viñas et al. (2000) muitas vezes a falta de exatidão dos resultados das análises ocorre devido a erros de amostragem, contaminação, perdas durante o transporte das amostras, pré tratamentos, decomposição (em casos de compostos orgânicos) e outras etapas do processo. (HOENIG et al., 1998).

De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidencia objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

Para validar e executar um método, o laboratório deve atender aos requisitos do DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010) e ABNT NBR ISO/IEC 17025. Além destes, no presente trabalho também foram adotados os parâmetros de aceitação exigidos pelo Regulamento (CE) 657/2002, Comunidade Européia. Para a validação do método a ser utilizado para determinação de cádmio em amostras vegetais, foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: sensibilidade, linearidade, seletividade ou efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, repetitividade, reprodutibilidade, precisão e exatidão (INMETRO, 2010).

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, logo o método é mais sensível quando mesmo pequenas variações de concentração resultam em variação na resposta. Sua verificação deve ser diária, pois a mesma pode ser afetada por variações do dia-a-dia como, temperatura e corrente elétrica da sala de análise, reagentes utilizados, vida útil do tubo e contato de grafite, entre outros.

A linearidade tem por objetivo expor os limites da faixa de concentração do analito que coincidem com a faixa dinâmica linear no equipamento em que se faz a leitura, e certificar que não haja impactos indesejáveis na resposta, ou seja, obter respostas diretamente proporcionais de sua concentração na amostra (NOËL et al., 2005). Desta forma, concentrações fora desta faixa não são consideradas confiáveis. Quando os experimentos para linearidade são realizados com soluções padrão, situação em que o analito está completamente disponível, torna-se importante verificar se há interferência da matriz na quantificação do elemento. Esta verificação é realizada por meio do estudo da seletividade e/ou efeito de matriz. Nestes ensaios analisa-se a capacidade do método na discriminação entre a substância a analisar e substâncias análogas, produtos de

degradação, componentes da matriz, entre outros que podem reduzir ou aumentar o sinal (o comportamento do sinal frente aos interferentes pode ser dependente da sua concentração na amostra) (INMETRO, 2010).

Quando se trabalha com elementos traços, o limite de detecção (L.D.) é de suma importância para determinar a menor concentração do analito capaz de produzir sinal analítico, ou seja, deduzir o teor mínimo a partir do qual é possível detectar a presença do analito com certeza analítica razoável (95% de confiança), enquanto que o limite de quantificação ou limite de determinação (L.Q.) é o teor mínimo medido a partir do qual é possível quantificar o analito com certeza estatística razoável (95% de confiança) (Regulamento (CE) 333/2007). Noël et al. (2005) utilizaram o L.D. como forma de identificar contaminação cruzada e/ou efeito de memória no preparo de amostras por meio de leitura de brancos com concentração abaixo deste limite.

A recuperação é definida como a proporção da quantidade do analito, presente ou adicionada na porção analítica da matriz, que é extraído e passível de ser quantificável. Impasse deste procedimento é que a o analito adicionado à amostra não está necessariamente disposto da mesma forma que aquele originalmente presente na matriz. Para estudo do real desempenho do método, recomenda-se analisar amostras naturalmente contaminadas com o analito. Nos materiais de referência certificados (MRC) a concentração do(s) analito(s) na amostra é previamente estabelecida.

A extensão de escopo não faz parte da validação, porém sua realização torna-se importante como forma de ampliar a utilização do método para outras matrizes de interesse. Além disso, segundo TOKMAN, 2007, a técnica de suspensão pode ser utilizada para muitas matrizes sem necessidade de grandes modificações, frente a isso torna-se interessante e extremamente útil estender o escopo de utilização do método para outras matrizes vegetais.

Sendo assim este trabalho objetivou validar um método analítico de com preparo de amostra na forma de suspensão ácida para a determinação de cádmio em alface por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

4.2 Material e Métodos

Todos os experimentos foram realizados em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (Figura 3.2) (modelos AAnalyst 800 e AAnalyst 600, marca Perkin Elmer), com a programação e parâmetros instrumentais já expostos na tabela 3.15.

Todas as soluções padrão de Cd utilizadas durante a validação foram provenientes de solução estoque de 1000 mg L^{-1} (marca VHG LABS).

A validação foi realizada com as amostras de alface (seca e moída a ≤ 0,5 mm) preparadas na forma de suspensão em tubos de polipropileno (PP) com volume final de 25 mL.

Toda a validação foi conduzida segundo as exigências dos Regulamentos (CE) 657/2002 e 333/2007 da Comunidade Européia e documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2010).

Foram usados como modificadores químicos solução de $Mg(NO_3)_2$, 3,0 µg, e de $NH_4H_2PO_4$, 50,0 µg. Os tubos de grafite foram descartados em média após completarem 300 queimas e o equipamento foi programado para realizar três leituras consecutivas de cada amostra.

4.2.1 Linearidade e Faixa Linear de Trabalho

Foram feitas sete soluções intermediárias de Cd com concentração 100 µg L^{-1} em solução HNO_3 5,0% v/v. A partir de cada uma destas soluções intermediárias foram feitas sete soluções de uso nas concentrações de 1,0 µg L^{-1}, 2,0 µg L^{-1}, 4,0 µg L^{-1}, 6,0 µg L^{-1}, 8,0 µg L^{-1} e 10,0 µg L^{-1} em meio de HNO_3 0,2% v/v. Este procedimento foi adotado visando obter maior independência entre as sete baterias dos seis níveis de concentração avaliados.

Para avaliação da relação de dependência entre a resposta medida e a concentração do analito utilizou-se a seguinte eq. (2) (INMETRO, 2010):

$$y = a + bx \tag{2}$$

Sendo:

y = resposta medida (absorvância);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica (sensibilidade);

As soluções padrão e a curva de calibração devem ser preparadas, sempre que possível, da mesma forma como serão empregadas na rotina, respeitando o coeficiente de correlação, R^2, mínimo de 0,995 para aceitação da curva analítica. Para o parâmetro faixa de trabalho, é recomendado que o primeiro ponto da curva analítica seja correspondente ao limite de quantificação do método, sendo o ponto superior geralmente restringido pela resposta do equipamento.

Estatística

Aplicou-se o teste de Dixon para a verificação de possíveis valores discrepantes. Verificou-se a homocedasticidade, independência e normalidade de distribuição dos resíduos com os testes de Levene, Durbin-Watson e Anderson-Darling, respectivamente.

4.2.2 Repetitividade

Para estudo da repetitividade pesou-se 0,5 g de alface em 7 replicatas para os níveis de adição de padrão em 1,0 TMC (200 $\mu g\ kg^{-1}$) e 0,2 TMC (40 $\mu g\ kg^{-1}$).

As condições de repetitividade foram cuidadosamente estabelecidas da seguinte forma, segundo as legislações supracitadas: preparo de amostra em dois dias diferentes em um curto intervalo de tempo; as duas baterias de amostras foram analisadas em dias diferentes, mas também em um curto intervalo de tempo; as análises foram realizadas pelo mesmo analista (preparo de amostra e leitura), no mesmo laboratório e equipamento.

Estatística

Calculou-se a concentração de cada amostra e também a concentração média, desvio-padrão e coeficiente de variação em condições de repetitividade (CV_r) dentro de cada nível de fortificação. Após, calculou-se o coeficiente de variação teórico para cada nível de concentração utilizando a equação de Horwitz (eq. 3) (INMETRO, 2010).

$$CV_{Horwitz}=2^{(1-0,5\log C)} \qquad (3)$$

Em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de dez (eq. 4) (INMETRO, 2010):

$$C = \text{Concentração teórica } (\mu g\ kg^{-1}) \times 10^{-9} \qquad (4)$$

Segundo recomendação do INMETRO (2010) utilizou-se o valor de HORRAT ($HORRAT_r$) para avaliar a precisão dentro da repetitividade, para este fim empregou-se a eq. (5).

$$HORRAT_r = \frac{CV_r}{CV_{r,Horwitz}} \qquad (5)$$

Nota: Os valores de HORRAT devem ser menores que 1 para que os valores de repetitividade sejam satisfatórios.

O limite de repetitividade (r) foi calculado segundo a eq. (6) (Regulamento (CE) 333/2007):

$$r = 2,8 \times s_r \qquad (6)$$

No caso de análises de amostras em condições de repetitividade, o coeficiente de variação da média deve estar entre metade e dois terços dos valores descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Coeficientes de variação aceitáveis para condições de repetitividade com amostras brancas fortificadas

Fração mássica	**CV_r (%)**
≥ 10 $\mu g\ kg^{-1}$ a 100 $\mu g\ kg^{-1}$	20
> 100 $\mu g\ kg^{-1}$ a 1000 $\mu g\ kg^{-1}$	15
≥ 1000 $\mu g\ kg^{-1}$	10

Fonte: Regulamento (CE) 657/2002

4.2.3 Reprodutibilidade intralaboratorial

Para estudo da reprodutibilidade intralaboratorial, pesou-se 0,5000 g de amostra em 7 replicatas para os níveis de adição de padrão em 1,0 TMC (200 $\mu g\ kg^{-1}$) e 0,2 TMC (40 $\mu g\ kg^{-1}$). Conjuntamente a estas amostras, procedeu-se o preparo de três brancos de amostra e um branco de reagente.

Este experimento foi realizado 37 dias após os ensaios de repetitividade, uma única vez com analista e equipamento diferentes dos empregados nos ensaios de repetitividade.

Estatística

Calculou-se, a partir dos resultados obtidos nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial, a concentração média, desvio-padrão e CV de cada dia. Calculou-se o valor de HORRAT em condições de reprodutibilidade intralaboratorial ($HORRAT_R$), segundo a eq. 5 (os valores devem ser inferior a 1), e obteve-se o limite de reprodutibilidade (R) segundo a eq. (6).

Para a reprodutibilidade intralaboratorial aceitou-se CV das amostras fortificadas quando este não excedeu os parâmetros da tabela 4.1.

4.2.4 Exatidão a partir de MRC

Para estudo da exatidão do método utilizou-se material de referência certificado (MRC) de arroz SRM 1568a (National Institute of Standards e Technology). Foram analisadas quatro replicatas do MRC (450 µm; 8% de umidade), sendo realizadas quatro leituras de cada replicata.

Estatística

Calculou-se a média de recuperação das quatro replicatas, desvio-padrão e coeficiente de variação. A exatidão é obtida pela seguinte eq. (7):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração média encontrada} \times 100}{\text{concentração certificada}} \qquad (7)$$

A exatidão foi obtida comparando-se a concentração média obtida com o valor certificado. Calculou-se a incerteza do processo de medição pelo desvio-padrão na eq. (8):

$$\sigma_D = \sqrt{\sigma_L^2 + \frac{s^2}{n}} \qquad (8)$$

Sendo:

σ_L = incerteza do MRC informado no certificado;

s = desvio-padrão das medidas em condições de repetitividade;

n = número de replicatas de amostras;

O método será considerado tão exato quanto o requerido caso a diferença entre a média das concentrações determinadas e o valor certificado for menor ou igual a duas vezes a incerteza do processo de medição, σ_D.

4.2.5 Precisão a partir de MRC

A precisão com utilização de MRC foi determinada a partir dos mesmos resultados utilizados para cálculo da exatidão. Comparou-se o desvio-padrão em condições de repetitividade das medidas (s) com o valor requerido do desvio-padrão intralaboratório (σ_{wo}), desvio este que obtido pela seguinte eq. (9):

$$\sigma_{wo} = \text{concentração certificada} \times \text{C.V.} \qquad (9)$$

O CV deve estar dentro da faixa aceitável de acordo com a fração mássica que compreende a concentração certificada (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Valores aceitáveis de coeficiente de variação de acordo com a fração mássica de concentração do MRC

Fração mássica	CV (%)
$\geq 10\ \mu g\ kg^{-1}$ a $100\ \mu g\ kg^{-1}$	20
$> 100\ \mu g\ kg^{-1}$ a $1000\ \mu g\ kg^{-1}$	15
$\geq 1000\ \mu g\ kg^{-1}$	10

Fonte: Regulamento (CE) 657/2002

<u>Estatística</u>

Utilizou-se a eq. 10 para tomada de decisão:

$$\chi^2_{decisão} = \left(\frac{\chi^2_{(n-1);\,0,95}}{n-1} \right) \qquad (10)$$

Comparou-se o resultado com a tabela de X^2 a 95% de confiança para decisão sobre a precisão intralaboratorial requerida.

4.2.6 Sensibilidade

A sensibilidade é conferida pelo valor de massa característica, o que demonstra o desempenho do equipamento frente à especificação do fabricante. Uma variação dentro da faixa de ± 20% do valor recomendado pelo fabricante é aceitável. Para o Cd, a massa característica é de 1,3 pg para um sinal de absorvância integrada de 0,0044 s, e deste modo com valores de aceitação compreendidos entre 1,1 a 1,5 pg.

4.2.7 Recuperação

Foram utilizados os resultados obtidos nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial para avaliar este parâmetro, pois as amostras destes experimentos foram fortificadas com Cd.

A recuperação foi calculada segundo a eq. (11) (INMETRO, 2010):

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right] \times 100 \quad (11)$$

Sendo:

C_1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = concentração teórica do analito na amostra fortificada;

<u>Estatística</u>

A partir dos resultados desta equação calculou-se a recuperação média e o CV dentro de cada nível de adição, sendo que a variação entre as replicatas obrigatoriamente deve ser menor que 15%, de acordo com o nível de fortificação (Regulamento (CE) 657/2002) e a recuperação (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Intervalo dos valores de recuperação aceitáveis de acordo com a faixa de adição

Concentração ($\mu g\ kg^{-1}$)	Recuperação (%)
≤ 1	50 a 120
>1 a ≤ 10	60 a 120
> 10 a ≤ 100	70 a 110
>100	80 a 110

Fonte: Regulamento (CE) 657/2002

4.2.8 Limite de Detecção (L.D.)

Realizou-se análise de 28 replicatas da matriz alface, considerada como amostra branca, sem adição de Cd. A partir dos resultados obtidos calculou-se o valor de desvio-padrão e a média das leituras. O limite de detecção foi obtido a partir de três vezes o desvio-padrão do ensaio (eq. 12) e deve ser menos de um décimo do TMC (Regulamento (CE) 333/2007).

$$L.D. = 3 \times s \quad (12)$$

Onde:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com a matriz branca, em condições de repetitividade;

4.2.9 Limite de Quantificação (L.Q.) e Confirmação

Para determinação do limite de quantificação foram analisadas 28 replicatas de amostras de alface sem adição de Cd. A partir dos resultados obtidos calculou-se o desvio-padrão e média das leituras. O L.Q. é numericamente igual dez vezes o desvio-padrão da média dos ensaios em branco (CE 333/2007) (eq. 13). O L.Q. deve ser menor que um quinto do TMC.

$$L.Q. = 10 \times s \quad (13)$$

Onde:

s = desvio-padrão da média dos ensaios com matriz branca ($n > 20$).

A confirmação do valor do L.Q. foi realizada por meio de pesagem de 8 replicatas de 0,5000 g da matriz branca fortificada no respectivo nível do LQ.

Estatística

Para aceitação do valor a ser confirmado para a recuperação do analito no nível do L.Q. (eq. 11) estes devem alcançar valores de acordo com a tabela 4.4 e CV de acordo com a tabela 4.2.

Tabela 4.4 – Variação aceitável de recuperação de acordo com a concentração mássica a ser adicionada

Fração mássica	Intervalo de recuperação
≤ 1 µg kg^{-1}	- 50% a + 20%
> 1 µg kg^{-1} a 10 µg kg^{-1}	- 30% a + 10%
≥ 10 µg kg^{-1}	- 20% a + 10%

Fonte: Regulamento (CE) 657/2002

4.2.10 Seletividade e Efeito de Matriz

Foram analisadas 7 replicatas de amostra de milho e soja, fortificadas no momento do preparo das suspensões nos níveis 1,0 TMC e 0,2 TMC juntamente com 7 replicatas de padrões para os mesmos níveis.

Estatística

Utilizou-se o teste de Dixon para identificação de possíveis *outliers*. Em seguida realizou-se o cálculo de média aritmética, desvio-padrão e coeficiente de variação. Não se admitiu variação maior que 10% entre as sete replicatas de amostras e dentro das replicatas de padrão para cada nível (Regulamento (CE) 657/2002).

4.2.11 Extensão de Escopo

Estudou-se a extensão de escopo para as matrizes milho e soja. Pesou-se 0,5000 g de alface em 7 replicatas com adição de Cd nos níveis 20 µg kg^{-1} e 100 µg kg^{-1} para efeito de comparação com a matriz milho e mais 7 replicatas com adição de 40 µg kg^{-1} e 200 µg kg^{-1} para efeito de comparação com a matriz soja. Estes valores são correspondentes a 0,2 e 1,0 TMC de cada uma destas duas matrizes.

Estatística

Foi aplicado o teste de Dixon para exclusão de valores discrepantes. Calculou-se a média, desvio-padrão e coeficiente de variação dos resultados dentro de cada nível. O coeficiente de variação não deve ser superior a 10%. Aplicou-se o teste de Hartley ($F_{máx}$) para verificação da homogeneidade de variâncias. Para aceitabilidade de ausência de efeito matriz a concentração obtida experimentalmente não deve ultrapassar ±10 % da concentração experimental encontrada na matriz de validação.

4.3 Resultados e Discussão

Todas as amostras vegetais foram lavadas previamente a moagem, pois segundo Pandey e Pandey (2009) a deposição de partículas do ar pode alterar os resultados obtidos para Cd. Os mesmos encontraram que as folhas apresentaram a maior deposição. Deste modo, a lavagem torna-se importante visto que a matriz de eleição para validação foi a alface.

Na tabela 4.6 estão dispostos todos os resultados da fase de validação, resultados estes, que estão de acordo com as exigências do Regulamento (CE) 657/2002, DOQ-CGCRE-008 do Inmetro (2010) e Regulamento (CE) 333/2007.

Tabela 4.5 – Resultados obtidos para a validação do método para a determinação de cádmio em suspensão de alface por GF AAS

Parâmetro		Resultado	Rec. (%)	C.V. (%)
Linearidade		R^2 = 0,9974 Resíduos normais, homocedásticos e independentes	N.A.	N.A.
L. detecção		0,40 µg kg^{-1} (± 0,05)	N.A.	N.A.
L. quantificação		2,5 µg kg^{-1} (± 0,45)	109,32 ± 16,90	15,42
Precisão/ Exatidão (MRC)		24,97µg kg^{-1} (± 0,62)	N.A.	2,48
Repetibilidade/ Recuperação	1° dia	0,2 TMC – 35,60 µg kg^{-1} (± 3,15)	84,38 ± 7,43	8,85
		1,0 TMC – 179,86 µg kg^{-1} (± 9,82)	84,79 ± 4,58	5,46
	2° dia	0,2 TMC – 35,34 µg kg^{-1} (± 1,84)	83,76 ± 4,20	5,20
		1,0 TMC – 180,46 µg kg^{-1} (± 8,54)	85,06 ± 3,87	4,73
Reprodutibilidade	1° dia	0,2 TMC – 35,34 µg kg^{-1} (± 1,84)	83,76 ± 4,20	5,20
		1,0 TMC – 180,46 µg kg^{-1} (± 8,54)	85,06 ± 3,87	4,73
	2° dia	0,2 TMC – em andamento	N.A.	N.A.
		1,0 TMC – 197,71 µg kg^{-1} (± 7,93)	93,20 ± 3,48	3,74
Sensibilidade*		1,3 pg/0,0044 A-s (± 20%)	N.A.	N.A.
Seletividade	0,2 TMC	Alface – 15,27 µg L^{-1} (± 0,29)	N.A.	1,92
		Padrão – 15,96 µg L^{-1} (± 0,23)	N.A.	1,43
	1,0 TMC	Alface – 75,28 µg L^{-1} (± 1,62)	N.A.	2,15
		Padrão – 73,75 µg L^{-1} (± 3,52)	N.A.	4,77

* A sensibilidade sempre foi testada antes de todas as determinações.
Rec = recuperação; C.V. = coeficiente de variação; N.A. = não se aplica.

4.3.1 Linearidade

Os resultados dos testes de homogeneidade, normalidade e independência dos resíduos estão expostos na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Testes realizados nos resíduos dos experimentos para determinação da linearidade e faixa de trabalho

Teste	Valor calculado	Valor tabelado
Levene	1,1810	2,5336
Durbin-Watson	2,0069	>1,5
Anderson-Darling	0,4582	0,05

P = 0,05

Observa-se que os pontos escolhidos para composição da curva de calibração foram adequados. A figura 4.1 demonstra o comportamento das absorvâncias geradas nas leituras de cada concentração.
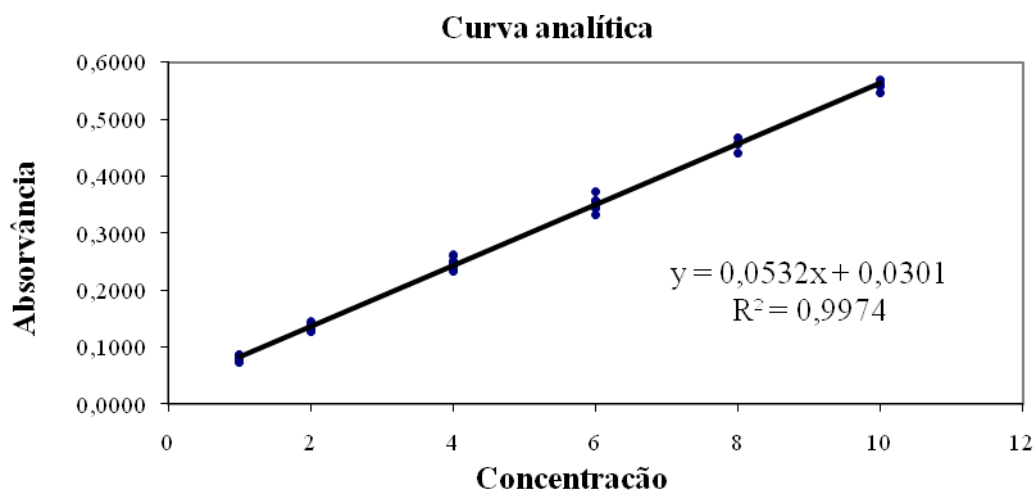
Figura 4.1 – Faixa linear de trabalho da curva analítica utilizada para determinação de Cd pelo método de suspensão ácida em GF AAS

Foi confirmada linearidade na faixa de trabalho exposta na tabela 4.5. O Regulamento (CE) 657/2002 recomenda utilizar cinco níveis de concentração (0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 TMC) com seis replicatas de solução para cada nível.

Porém estes níveis estão acima do intervalo já conhecido de linearidade do espectrômetro para o elemento Cd. Segundo Tyler (2011) a faixa linear do GF AAS é muito limitada, entre 10^2 e 10^3, logo concentrações mais altas só podem ser utilizadas quando linhas menos sensíveis forem escolhidas.

Logo, os pontos escolhidos para composição da curva foram baseados no conhecimento prévio dos analistas do laboratório e na faixa linear de resposta do equipamento. Mesmo empecilho foi relatado por NOËL et al. (2005), por isso os autores também fizeram adaptações baseadas em experiência anteriormente adquirida no laboratório.

4.3.2 Sensibilidade

A sensibilidade foi avaliada previamente a cada análise. Sua verificação foi obtida por meio da observação da massa característica do Cd em solução padrão de concentração 2 µg L^{-1}. A sensibilidade foi considerada adequada quando a mesma não ultrapassou 20% do valor recomendado pelo fabricante (Tabela 4.5), ou seja, variação de 1,1 pg/ 0,0044 A-s a 1,5 pg/ 0,0044 A-s.

4.3.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de quantificação obtido experimentalmente foi de 0,53 µg L^{-1}. Porém a legislação recomenda que o L.Q. seja o primeiro ponto da curva analítica, logo realizou-se a confirmação em 1,0 µg L^{-1} (Tabela 4.5). A recuperação e o coeficiente de variação, parâmetros para aceitabilidade do resultado final, estão dentro do intervalo apresentado como bom desempenho (Tabela 4.2. e 4.4) demonstrando que o método é capaz de recuperar analito mesmo para baixos valores de adição.

Capelo et al. (1998) encontrou L.D. de 19 µg kg^{-1} e L.Q. de 60 µg kg^{-1} para cádmio em suspensão preparada com músculo de mexilhão por GF AAS, teores acima dos determinados neste trabalho. Porém estes são parâmetros passíveis de influência da matriz analisada, não somente do método empregado para preparo e determinação.

4.3.4 Precisão e Exatidão

A concentração de Cd encontrada para a análise do MRC (Tabela 4.5) está próxima ao valor certificado de 22 µg kg^{-1} (± 2 µg kg^{-1}), e também apresentou coeficiente de variação em conformidade com o requerido pela legislação (Tabela 4.2). A precisão, avaliada por meio do CV, está englobada no intervalo de 0,5 e 5% sugerido por Tyler (2011). Segundo este autor, a técnica de GF AAS tem boa precisão a curto prazo, pois com o avanço das utilizações (número de queimas) do tubo de grafite a precisão sofre alterações. Este resultado também está próximo ao encontrado por Minami et al. (1996) que determinou Cd no sobrenadante de amostras biológicas encontrando 3,4% de precisão, demonstrando que o método de suspensão é satisfatório neste quesito.

A precisão e exatidão estão em função do número de queimas do tubo de grafite, homogeneidade da suspensão, distribuição de partículas e representatividade da alíquota de material pesado para preparo da amostra (MILLER-IHLI, 1988). Porém em ensaios com utilização de sobrenadante o efeito do tamanho de partículas sobre a precisão é minimizado.

Por meio dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, utilizando os valores de recuperação de amostras fortificadas, também é possível calcular precisão e exatidão. Pode-se verificar pela tabela 4.5 que os coeficientes de variação das para as sete amostras fortificadas de todos estes ensaios permaneceram abaixo de 10%, como o requerido.

4.3.5 Repetitividade, recuperação e reprodutibilidade intralabarotorial

Com os resultados das amostras destinadas aos ensaios de repetitividade, obteve-se também avaliação da recuperação do analito (Tabela 4.5) e do primeiro dia da reprodutibilidade intralaboratorial. Os resultados de recuperação destes ensaios e coeficiente de variação estão em conformidade com o requerido para aprovação destes dois parâmetros (Tabela 4.3. e 4.1).

A reprodutibilidade foi realizada em dois dias, sendo que até o momento houve confirmação do desempenho do método para o nível de 1,0 TMC, porém os experimentos com validação continuarão mesmo após o término desta dissertação. Os valores obtidos para este nível (Tabela 4.5) estão em conformidade com o requerido para recuperação e coeficiente de variação (Tabela 4.3. e 4.1) sugerindo que o método é robusto em relação ao analista e demais condições de laboratório como temperatura, equipamento (segundo dia da reprodutibilidade foi realizada em equipamento diferente do primeiro dia) e lotes de reagentes.

4.3.6 Seletividade

Segundo Tyler (2011) o efeito da matriz é exibido por uma variação na retenção do analito no tubo de grafite dependendo do perfil da amostra. Sendo assim, quanto mais próximos os comportamentos da suspensão e padrão em solução, menor será esta interferência (ARSLAN e TYSON, 2007), fato este que ocorreu neste trabalho. Minami et al. (1996) observaram concordância entre curvas de calibração preparadas com solução padrão de Cd e sobrenadante de suspensão de folhas.

A utilização de mais de uma temperatura de secagem, modificadores químicos e medida de concentração por meio da área de pico auxiliam na minimização do efeito da matriz, os quais são alguns dos parâmetros das STPF.

Outra evidência de ausência de efeito da matriz na suspensão é o resultado obtido para o MRC ser concordante com o valor certificado, pois a determinação foi realizada em curva analítica feita contra padrões aquosos (Tabela 4.5).

4.3.7 Extensão de escopo

Até o presente momento foram realizados experimentos para as matrizes milho em nível 0,2 TMC e soja para os níveis 0,2 TMC e 1,0 TMC.

Tabela 4.7 – Resultados dos experimentos de extensão de escopo do método de suspensão ácida (HNO_3) para matrizes de milho e soja

TMC	Matriz	Concentração* ($\mu g\ kg^{-1}$) ± SD	Recuperação (%) ± SD	CV (%)
0,2 (20 $\mu g\ kg^{-1}$)	Alface	15,60 ± 0,63	73,57 ± 3,01	4,05
	Milho	17,35 ± 0,80	89,06 ± 4,08	4,64
1,0 (100 $\mu g\ kg^{-1}$)	Alface	111,59 ± 5,72	105,83 ± 5,59	5,12
	Milho	em andamento	N.A.	N.A.
0,2 (40 $\mu g\ kg^{-1}$)	Alface	40,33 ± 0,78	95,40 ± 1,83	1,92
	Soja	< L.Q.	N.A.	N.A.
1,0 (200 $\mu g\ kg^{-1}$)	Alface	200,66 ± 4,73	94,59 ± 2,03	2,36
	Soja	181,21 ± 4,44	91,49 ± 2,24	2,45

* Base da matéria natural;
TMC = teor máximo do contaminante; SD = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação da concentração; N.A. = não se aplica.

Análises para o nível 1,0 TMC em milho estão em andamento, ao passo que, os resultados dos ensaios já realizados (Tabela 4.7) estão em conformidade com as recuperações e coeficientes de variação requeridos exigidos pela legislação (Tabela 4.3 e 4.2 respectivamente). Entretanto há

sólidas evidências de que a extensão de escopo será bem sucedida para milho, pois os resultados obtidos durante o período de otimização do método foram obtidos a partir de fortificação em 1,0 TMC (Tabela 3.14, experimento 7).

Para soja já foi constatada impossibilidade de recuperação em adição no nível 0,2 TMC. Logo, o método não poderá se estendido para esta oleaginosa. Apenas pode-se afirmar que o método é capaz de determinar concentrações próximas ao permitido nesta matriz.

4.4 Conclusão

O método de suspensão com ácido nítrico para o preparo de amostras vegetais e determinação da concentração total de cádmio por GF AAS enquadra-se nos parâmetros exigidos pelo Regulamento (CE) 657/2002 e pelo INMETRO sendo passível de validação. Contudo, para a matriz soja não foi possível a confirmação do desempenho do método no nível 0,2 TMC, o que demonstra necessidade de otimização de novo método para esta matriz.

Referências

ARSLAN, Z; TYSON, J.F. Slurry sampling for determination of lead in marine plankton by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 86, n. 2, p. 227 – 234, Aug. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISSO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31 p.

CAPELO, J.L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of cadmium from slurried biological samples for electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 13, p. 1285 – 1290, Sept. 1998.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 657/2002, de. Fornece execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 17 Ago 2002, p. 8 - 36.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 333/2007, 28 de março de 2007. Estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 28 Março de 2007.

HOENIG, M et al. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 358, n.1, 1998. P. 85-94.

INMETRO – Orientações sobre validação de métodosanalíticos, DQO-CGCRE-008, Fevereiro de 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2010.

MILLER-IHLI, N.J. Slurry sample preparation for simultaneous multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 3, p. 73-81. Jan. 1988.

MINAMI, H.; HONJYO, T.; ATSUYA, I. A new solid-liquid extraction sampling technique for direct determination of trace elements in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B – Atomic Spectroscopy**, Great Britam , v. 51, n. 2, p. 211 – 220, 30 Jan. 1996.

PANDEY, J; PANDEY, U. Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 148, n. 1-4, p. 61-74, 2009.

TOKMAN, N. The use of slurry sampling for the determination of manganese and copper in various samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, n. 1-2, p. 87 – 94, 8 May. 2007.

TYLER, G. **ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared**. Jobin Yvon Horiba ICP Optical Emission Spectroscopy Technical Note 05. Jobin Yvon Inc.: Edison, New Jersey, USA. Disponível em: http://www.jobinyvon.com/usadivisions/Emission/applications/TN05.pdf . Acesso em: 23 abril 2011.

VIÑAS, P.; PARDO-MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Rapid determination of selenium, lead and cadmium in baby food samples using electrothermal atomic absorption

spectrometry and slurry atomization. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 412, n. 1/2, p. 121-130, 08 May, 2000.

5 APLICAÇÃO DO MÉTODO – ESTUDO DE CASO COM BOVINOS DE CORTE EXPLORADOS EM PASTAGEM TROPICAL SOB MANEJO INTENSIVO

Resumo

Em vista da crescente preocupação mundial com segurança alimentar, torna-se fundamental a países exportadores demonstrar qualidade na produção de alimentos. Este projeto, em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, objetivou avaliar a presença do contaminante inorgânico cádmio (Cd) na cadeia produtiva de gado de corte mantido em pastagem tropical. O presente estudo foi conduzido em área experimental do Departamento de Zootecnia da USP/ESALQ com 63 bovinos de corte desmamados ½ sangue Nelore x Canchim em área de *B. brizantha* sob sistema de lotação rotacionada. Ao fim da fase de recria os animais foram alimentados em confinamento até atingir o peso de abate. O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados com três tratamentos com três repetições de acordo com o nível de suplementação, sendo T_1 – apenas sal mineral *ad libitum*; T_2 – mineral + milho moído (0,3% do peso vivo – P.V.); T_3 – mineral + milho moído (0,3% até 0,9% P.V.). Durante todo o período experimental coletou-se amostras de pasto, feno (Tifton – 85), milho, soja e sorgo cujas análises foram pelo método de suspensão ácida com determinação em espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS). Análises de solo da área de pastagem e água dos bebedouros foram realizadas pelas técnicas de EPA 3051 com determinação em ICP-AES e Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, respectivamente. Os resultados de análise da água estiveram abaixo do limite de quantificação (L.Q.) de 0,0025 mg L^{-1}. O solo apresentou pH ácido de 5,4 com 1,5 mg kg^{-1} de Cd. Algumas amostras vegetais permaneceram abaixo do L.Q., como a pastagem (13 µg kg^{-1}), milho grão e farelo de soja (8 µg kg^{-1}). Já as amostras de feno e sorgo grão permaneceram acima do L.Q., porém abaixo do limite máximo permitido (200 µg kg^{-1}). Foram analisadas 27 amostras de fígado e de rim pelo método de calcinação. As amostras de fígado apresentaram teor abaixo do LQ (22 µg kg^{-1}) e as de rim abaixo do limite máximo permitido (1000 µg kg^{-1}). Os tratamentos de milho fornecidos não influenciaram de forma significativa os teores de Cd nos órgãos analisados. A análise estatística para as amostras vegetais foi de caráter descritivo consistindo na comparação de médias e análise do coeficiente de variação entre replicatas de amostras. Os resultados de rim foram transformados por meio de logarítimo na base 10 pelo programa estatístico SAS, e as médias comparadas pelo teste t a 5% de significância. Não foram encontrados teores prejudiciais de Cd em nenhuma das amostras analisadas.

Palavras-chave: Cádmio; GF AAS; Contaminante inorgânico; Vegetais; Bovinos a pasto

Abstract

The aim of this work, with Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, was evaluate Cd in animal food chain raised in tropical pasture. This experiment was conducted in area of USP/ESALQ Animal Science Department with 63 ½ Nelore x ½ Canchim steers, under a rotational grazing system in B. brizantha, finishing animals in feedlot. The experimental design was a randomized block with three treatments and three replications: T_1 - mineral supplementation (MS) *ad libitum*; T_2 - MS + corn (0.3% body weight – BW); T_3 - MS + corn (0.6% up to 0.9% BW). Samples of pasture, hay (Tifton – 85), corn, sorghum, soybean meal that were analysed by slurry method in graphite furnace atomic absorbance spectrometry (GF AAS). Soil and water samples was analyzed by EPA 3051 technique in ICP-AES and Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, respectively. Some samples were under limit of quantification (LOQ) like pasture (13 µg kg^{-1}), soybean meal and corn (8 µg kg^{-1}) and water, while hay and sorghum were bellow acceptable levels (200 µg kg^{-1}). Soil pH was 5.4 with a Cd content of 1.5 mg kg^{-1}. The liver samples were under LOQ (22 µg kg^{-1}) and kidney samples were bellow acceptable levels (1000 µg kg^{-1}).There was no difference between treatments. The vegetables data were submitted to descriptive statistics, while kidney means were transformed by log (10) on SAS and compared by t test in 5% level. No hazardous Cd concentrations were observed in this trial.

Key words: Cadmium; GF AAS; Inorganic contaminant; Plant tissue; Beef cattle; Grazing

5.1 Introdução

A preocupação com a presença de contaminantes inorgânicos no solo e em alimentos tem crescido recentemente. Este fato é devido ao efeito tóxico destes elementos na saúde humana e animal: doenças ósseas, edemas de pulmão, disfunção renal, danos ao fígado, anemia e hipertensão (ADAMS et al., 2004).

Em 1978, as organizações FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization) estabeleceram consumo máximo de Cd em 70 μg dia^{-1} (ADAMS et al., 2004). Em 2006 e 2008 a União Européia estabeleceu limites máximos de Cd em alimentos (em base de matéria natural), de origem animal e vegetal. Sendo carne bovina (exceto miúdos) como fígado com 0,50 mg kg^{-1} e rim com 1,0 mg kg^{-1}, soja, feijão, arroz, trigo e folhas com 0,2 mg kg^{-1} e milho com 0,1 mg kg^{-1} (Regulamentos (CE) n° 629/2008 e (CE) nº 1881/2006).

Atualmente a imensa maioria dos trabalhos envolvendo cádmio no ambiente prioriza sua presença e disponibilidade no solo envolvendo contaminação proposital com lodo de esgoto (ADAMS et al., 2004; AITKEN, 1997; PHILLIPS, 2004; ZHAO et al., 2004; NOMURA e OLIVEIRA, 2006; DOWDY e VOLK, 1983), sendo menor o volume de estudos desenvolvidos com a preocupação de verificar a atual situação deste contaminante na cadeia de produção de alimentos. Trabalhos de triagem mostram-se importantes por contribuírem diretamente na identificação de áreas ou mesmo vias de contaminação com este elemento na a produção de ruminantes em pastagem. Torna-se difícil realizar com precisão esta triagem, pois geralmente os ingredientes utilizados nas rações e suplementos são oriundos de diversos locais, dos quais não se tem controle do sistema de cultivo e muitas vezes das condições de transporte dos mesmos. Os animais provenientes de propriedades cuja atividade exclusiva são a recria e engorda, são oriundos de locais distintos o que dificulta a rastreabilidade de sua origem.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), plano desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), busca oferecer ferramenta de triagem deste elemento por região, pois para o mesmo são coletadas e analisadas matrizes cárneas de todo o território nacional podendo assim identificar áreas com poluição ambiental, sendo anualmente os resultados desta triagem publicados no diário oficial da união. E com o recente incentivo para desenvolvimento do PNCRC-Vegetal (BRASIL, 2008), o mesmo

estudo poderá ser realizado em matrizes vegetais. Porém este plano analisa apenas o produto final da produção, não investigando a fonte de contaminação.

Com os avanços na intensificação dos sistemas de produção, como por exemplo, rotação de culturas e sistemas de integração lavoura-pecuária, os solos de pastagem recebem fertilização de diferentes fontes e doses, doses de defensivos agrícolas e até mesmo restos culturais o que pode modificar consideravelmente o teor de Cd no solo e, consequentemente, na forragem a ser ingerida pelos animais em curto espaço de tempo.

Os estudos de triagem, assim como o presente trabalho, devem guiar-se pelos limites descritos nas legislações vigentes, sendo que no Brasil os limites máximos deste contaminante nas matrizes água e solo estão determinados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2004) e CETESB (2005) respectivamente, porém para matrizes cárneas e vegetais os parâmetros de aceitação são os utilizados com base na legislação européia.

HIPÓTESE

A carne bovina e os ingredientes dietéticos oferecidos aos animais mantidos em regime de pastejo apresentam níveis de Cd dentro das faixas de tolerância aceitáveis.

OBJETIVOS GERAIS

Este projeto visou quantificar a presença de Cd em matrizes cárneas e em diferentes segmentos da cadeia de produção.

Objetivos específicos

✓ Determinar Cd pelo método de suspensão ácida nas seguintes matrizes:
- milho grão moído fino;
- farelo de soja;
- sorgo grão moído fino;
- pastagem (*B. brizantha*);
- feno (Tifton-85);

5.2 Material e métodos

5.2.1 Local e condução do experimento

O experimento foi instalado em área de pastagem do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, localizada no município de Piracicaba – SP (22°43' latitude sul, 47°25' longitude oeste e 580 metros de altitude) durante o período de novembro de 2008 a novembro de 2009.

O solo da área experimental é classificado como Nitossolo Vermelho Eutroférrico, com horizonte A moderado e textura variando de argilosa a muito argilosa (EMBRAPA, 1999).

5.2.2 Manejo da pastagem

O campo experimental, de 8,5 ha de área total. foi dividido em três blocos com alocação dos três tratamentos. A pastagem cultivada foi a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, semeada em 2003. Para cada tratamento foram demarcados 6 piquetes (este conjunto de 6 piquetes foi denominado módulo), sendo a coleta de forragem realizada em apenas três. Cada módulo foi provido de cochos e bebedouros próprios construídos em pequena área de descanso, simbolizados pelos pontos azuis na figura 5.1.

Figura 5.1 – Esquema de divisão da área experimental em blocos (bloco 1 – vermelho; bloco 2 – verde; bloco 3 – azul)

O manejo de pastagem adotado foi o de lotação rotacionada com entrada dos animais nos piquetes (pré pastejo) com altura de dossel de 25 cm de altura média (95% de interceptação de luz) e saída (pós pastejo) com altura média de resíduo em 15 cm (Costa, 2007). Os pastos foram adubados com 30 kg de nitrogênio por hectare na forma de uréia após o pastejo dos animais, durante os meses de novembro a abril, objetivando-se manter taxa de lotação entre 8 e 10 UA ha^{-1}. No mês de outubro os pastos foram adubados com 300 kg ha^{-1} de superfosfato simples, 150 kg ha^{-1} de cloreto de potássio e 30 kg ha^{-1} de FTE BR-12.

As alturas do dossel em pré e pós-pastejo foram tomadas em 20 pontos distintos ao longo da maior diagonal do piquete, com o uso de lâmina plástica e régua graduada em centímetros (Fagundes, 1999).

5.2.3 Animais experimentais

Foram utilizados 76 bezerros recém desmamados, não castrados, oriundos de mesma procedência, resultantes de cruzamento industrial de touros Canchim com vacas Nelore. Os animais iniciaram o período de adaptação em novembro de 2008, com aproximadamente 208 kg de peso vivo (P.V.) e 10 meses de idade. Destes animais, 63 foram utilizados como animais marcadores distribuídos em 3 tratamentos e os 13 restantes foram utilizados para ajuste de carga animal.

5.2.4. Tratamentos

Os tratamentos foram designados da seguinte forma:

Tratamento 1: 7 bovinos pastejando recebendo somente suplementação mineral *ad libitum*.

Tratamento 2: 7 bovinos pastejando recebendo 0,6% do P.V. (em base de matéria natural) de suplementação energética já acrescido o sal mineral.

Tratamento 3: 7 bovinos pastejando recebendo 0,3% P.V (em base de matéria natural) de suplementação energética entre as datas 20/12/08 a 23/02/09; 0,6% P.V. (em base de matéria natural) de suplementação energética entre as datas 24/02/09 a 16/04/09; 0,9% P.V. (em base de matéria natural) entre as datas 17/04/09 a 20/05/09, sendo todas as doses já acrescidas de sal mineral.

O suplemento foi formulado para conter 11% de proteína bruta, sendo composto por milho moído fino, mistura mineral e monensina sódica (Bovensin 200).

5.2.5. Engorda em confinamento

Após o período de pastejo, os 63 animais foram mantidos em confinamento até o abate (duração de aproximadamente 5 meses). Os mesmos foram tratados contra incidência de endoparasitas e ectoparasitas, vacinados contra febre aftosa e receberam complexo vitamínico ADE, via injeção subcutânea.

Todos os animais receberam a mesma dieta durante a fase de confinamento com período de adaptação de 21 dias. Após este período, a ração final foi composta de 12% volumoso e 88% de concentrado com base na matéria seca (MS), formulada de acordo com o NRC (1996) (Tabela 5.1). O arraçoamento, fornecimento da dieta completa, foi realizado uma vez ao dia as 14:00 horas. O feno, previamente triturado, foi pesado diretamente em vagão misturador (marca Casale, modelo Totalmix Express) equipado com balança eletrônica, enquanto que os ingredientes concentrados foram pesados separadamente em balança digital (marca Marte) sendo logo em seguida misturados ao feno no vagão misturador.

Tabela 5.1 – Ingredientes utilizados durante o período de confinamento (ração final)

Ingrediente	Inclusão (% MS)
Feno (Tifton-85)	12,0
Milho moído fino*	73,5
Melaço	6,0
Uréia	0,5
Farelo de soja	6,0
Calcário	0,5
Sal mineral	1,5

* Durante algumas semanas no início do confinamento o ingrediente sorgo moído fino substituiu a inclusão de milho grão moído.

Para engorda em confinamento os animais foram mantidos em instalação de piso de terra, sem cobertura, contendo cochos individuais e bebedouros coletivos (figura 5.2). A acomodação dos animais nas instalações foi realizada considerando-se o peso vivo e a distribuição dentro de

tratamentos e blocos durante a fase de pastejo. Logo, os lotes de 7 animais de cada tratamento foram divididos da seguinte forma: 3 animais pesados em uma baia e os outros 4 animais mais leves em outra baia. Este esquema foi repetido para 6 lotes, sendo que e lotes leves foram mantidos juntos em três baias diferentes. Desta forma foi totalizado 15 baias, sendo 6 baias com 3 animais, 6 baias com 4 animais e 3 baias com 7 animais.

Figura 5.2 – Bovinos de corte posicionados na instalação experimental de confinamento

5.2.6 Amostragens e análises

Durante as fases experimentais de pastejo e confinamento procedeu-se amostragem dos ingredientes concentrados, água consumida, forragem de cada piquete amostral e com seu respectivo solo origem. Ao final do experimento os animais foram abatidos em frigorífico localizado na cidade de Lençóis Paulista-SP, momento este em que foram coletadas as amostras de carne – fígado e rins.

5.2.7 Amostragem da forragem

A forragem amostrada para análise de Cd foi de acordo com o manejo da pastagem, sendo coletada em 3 dos 6 piquetes construídos para cada tratamento. Os piquetes de coleta foram escolhidos aleatoriamente no início do experimento.

A amostragem da forragem foi realizada na ocasião da entrada dos animais nos piquetes, sendo escolhidos três pontos de 25 cm de altura de dossel para coleta. Utilizou-se quadrado com área de 0,5 m^2 (0,5 m x 1,0 m) e altura de 15 cm para corte de toda a massa de forragem acima

desta altura (estrato pastejável). Esta forragem, logo após a coleta, foi seca em estufa de ventilação de ar forçada em temperatura de 55 °C por 72 horas para cálculo da massa seca.

A forragem foi analisada no Lanagro-SP pelo método de suspensão ácida (descrito no capítulo 1 e validado conforme descrição no capítulo 2).

5.2.8 Amostragem do solo

O solo foi amostrado em todos os piquetes escolhidos para amostragem da forragem. Com utilização de sonda, foi coletado dentro de cada piquete 20 subamostras em profundidade de 20 cm, de acordo com recomendado por Phillips (2004) (Figura 5.3). Seguidamente as subamostras foram homogeneizadas para formar amostra única por piquete, totalizando 27 amostras. As coletas foram realizadas logo após a saída dos animais da área experimental.

As amostra de solo foram analisadas no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) para determinação dos teores totais de Cd por digestão pelo método EPA 3051 com determinação em ICP-AES com limite de quantificação de 400 $\mu g\ kg^{-1}$.

Figura 5.3 – Coleta de solo com utilização de sonda

5.2.9 Amostragem da água

Na área de pastagem foram coletadas amostras de água a partir de bebedor de cada tratamento. A amostragem foi realizada uma única vez, após a saída dos animais da área

experimental de pastagem. No período de confinamento procedeu-se amostragem única de um bebedouro dentre os 15 existentes. Essa postura foi adotada pelo fato do abastecimento de água ser de origem comum a todos os bebedouros. A água foi coletada em frascos de 1,0 L enviados pelo laboratório, sendo as amostras acondicionadas em refrigerador a -10 °C e posteriormente enviadas ao CenterLab em Araraquara-SP, analisadas segundo metodologias do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005 e United States Environmental Protection Agency – USEPA, com limite de quantificação de 0,0025 mg L^{-1}.

5.2.10 Dieta

Dentre os ingredientes fornecidos durante todo o experimento foram amostrados: milho moído fino durante o período de pastejo, e no confinamento milho moído fino, sorgo moído fino, feno de tifton-85 e farelo de soja. Todas estas amostras foram secas em estufa de ventilação de ar forçada a 65 °C por 72 horas na USP/ESALQ em Piracicaba – SP para determinação da matéria seca, sendo moídas e analisadas no Lanagro-SP em Campinas.

A metodologia de análise destes ingredientes foi a mesma descrita anteriormente no capítulo 1 (pesagem de 3,000 g de amostra em base de MS).

5.2.11 Fígado e rim

As amostras de carne foram obtidas durante o abate dos animais. Coletou-se 500 g de fígado e os dois rins somente dos animais experimentais. Após a coleta as amostras foram transportadas em caixas de isopor contendo gelo seco e seguidamente armazenadas em freezer a -20 °C na USP/ESALQ.

Para as amostras de fígado e rim, foram escolhidos aleatoriamente 3 animais dentre os 7 de cada tratamento. As mesmas foram preparadas no Lanagro-SP pelo procedimento de calcinação e analisadas por GF AAS, cujo limite de quantificação para o método é de 22 μg kg^{-1}. Cada amostra de carne foi analisada em duplicata sendo a análise repetida quando o coeficiente de variação entre replicatas foi maior que 10%.

5.2.12 Metodologia estatística

As análises das amostras de vísceras para a determinação de Cd foram realizadas considerando delineamento de blocos completos casualizados, com três tratamentos, três

repetições e média de 9 animais por tratamento. A análise exploratória destes dados foi realizada por meio da análise gráfica dos resíduos e teste de homogeneidade de variâncias, com aplicação do teste de Levene pela ferramenta proc GLM do programa estatístico SAS. Os dados de Cd em rim não atenderam as pressuposições de normalidade, logo foram transformados por logaritmo na base 10 sendo apresentadas as médias geométricas dos quadrados mínimos (Least Square Means) retransformados 10^x seguidas por intervalos de confiança de 95%. As médias foram comparadas pelo test t a 5% de significância.

As amostras vegetais foram estudadas por meio de estatística descritiva, como média de concentração, desvio-padrão entre replicatas (de amostra e de leitura) e coeficiente de variação.

5.3 Resultados e discussão

Os resultados das determinações de Cd nas amostras de água permaneceram abaixo do limite de quantificação do método empregado (< 0,0025 mg L^{-1}) e consequentemente inferiores ao valor máximo permitido pelo Ministério da Saúde, cujo valor é 0,005 mg L^{-1} (BRASIL, 2004).

Ao total foram coletadas 27 amostras de solos, cujos teores totais estão abaixo do limite máximo de 3,0 mg kg^{-1} imposto pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (BRASIL, 2005) (Tabela 4.2) para solos agricultáveis (em base de peso seco). Porém, segundo classificação desta legislação (BRASIL, 2005), as concentrações deste trabalho podem ser consideradas com status de prevenção, pois estão acima de 1,3 mg kg^{-1}. Segundo Kabata-Pendias (2001), teores próximos a 1,1 mg kg^{-1} são considerados normais em solos não contaminados, conceito este que se aplica as concentrações obtidas neste experimento, pois estão próximas a este valor.

Tabela 5.2 – Resultados das determinações de Cd e valores de pH da área experimental com amostragem por bloco

Bloco	**Concentração (mg kg^{-1})**	**pH**
Bloco 1	1,47 ± 0,21	5,5
Bloco 2	1,40 ± 0,17	5,3
Bloco 3	1,62 ± 0,39	5,4

Concentração de Cd em base de matéria seca.
pH analisado em $CaCl_2$.

Todas as amostras de forragem analisadas apresentaram teores não quantificáveis de Cd (Tabela 5.3). Estes dados estão abaixo de exemplos relatados na literatura como Aitken (1997) que analisando pastagem de *Agrostis capillaris* no Reino Unido encontrou teor próximo de 150 $\mu g\ kg^{-1}$ e Bertrand et al. (1980) teor de 270 $\mu g\ kg^{-1}$ em pastagem de pensacola (ambos teores expressos em base de matéria seca).

Há forte relação entre o Cd existente na planta e no solo, porém a absorção radicular está fortemente ligada com a forma química e solubilidade do Cd na solução do solo, solubilidade esta que é dependente dentre outros fatores do pH e teor de argila do solo (PANDEY e PANDEY, 2009; KABATA-PENDIAS, 2001; AITKEN, 1997; DOWDY e VOLK, 1983).

Os valores de pH da área experimental estão dentro da faixa favorável a disponibilidade do Cd para solução do solo (Tabela 5.1), pois segundo Kabata-Pendias (2001) esta faixa está compreendida entre 4,5 a 5,5, com mobilidade máxima em condições de pH entre 4,0 a 4,5. Quanto mais argiloso, menor a mobilidade deste elemento para a solução do solo (KABATA-PENDIAS, 2001). O solo da área experimental é classificado como muito argiloso, logo seu perfil de constituição pode ter contribuído para os baixos valores encontrados na forragem.

Considerando apenas o pH da área e a sua textura argilosa, pode-se planear que o Cd presente no solo possua considerável fração indisponível, porém outros fatores igualmente relevantes como presença de óxidos e matéria orgânica não foram analisados, logo pode-se considerar que a presença desses fatores não tenha permitido grande mobilidade do elemento para a solução do solo o que contribuiu para o baixo teor na forragem.

Outro fator interessante é que embora os fertilizantes fosfatados sejam veículo de inserção deste elemento no solo, os mesmos aumentam consideravelmente a indisponibilidade do Cd no solo (KABATA-PENDIAS, 2001). Embora no presente experimento não tenha sido realizado este perfil de adubação, o local estudado já constitui área experimental a muitos anos, o que reflete em diversos momentos de adubação ao longo de sua utilização.

Segundo dados experimentais de Adams et al. (2004) e Pandey e Pandey (2009) existe diferença de absorção de Cd entre as espécies vegetais e, mesmo entre cultivares, logo outra espécie poderia apresentar teores de Cd diferenciados dos encontrados para *B. brizantha* nestas mesmas condições de solo.

Os resultados de Cd nas folhas da pastagem podem sugerir que a atmosfera na área possua baixo teor de Cd, pois segundo Zhao et al. (2004) a contribuição da deposição atmosférica na

concentração de contaminantes inorgânicos em vegetais é expressiva. Pandey e Pandey (2009) encontraram que a deposição de Cd em vegetais pelo ar foi a principal fonte na contribuição do seu teor nas plantas estudadas. Os autores explicam que as plantas geralmente captam nutrientes e elementos traços disponíveis no ar e citam trabalho em que 12 - 60% do Cd determinado nas folhas de culturas agrícolas foi proveniente de deposição atmosférica.

Os resultados dos ingredientes do suplemento e da ração (Tabela 5.3) são de difícil justificativa, pois são de origens diversas o que sugere diferentes condições de cultivo, armazenamento e transporte. É possível que as diferenças nos teores de Cd em milho e sorgo sejam provenientes da fase anterior a sua compra pela ESALQ/USP, pois chegando a universidade estes dois ingredientes foram submetidos as mesmas condições de armazenamento e moagem.

O intuito das avaliações na forragem e nos grãos foi verificar a ingestão de Cd pelos animais na forma como ocorreria no campo e no confinamento, logo não foi realizada a lavagem das amostras com água desionizada anteriormente a sua moagem, pois segundo alguns trabalhos a contaminação física da superfície dos vegetais pode resultar em concentrações maiores do que se houvesse apenas o fator absorção radicular e translocação entre tecidos (AITKEN, 1997; PANDEY e PANDEY, 2009).

Dentre as amostras de fígado analisadas, somente uma apresentou concentração acima do limite de quantificação, com valor de 23 $\mu g\ kg^{-1}$, sendo o restante das 26 amostras todas com teores não quantificáveis (Tabela 5.4). Isto demonstra a isenção de Cd da carne produzida nas condições deste experimento, pois Nomura e Oliveira (2006) estudando amostras de fígado bovino adquiridas em açougues na cidade de São Paulo encontraram teores próximos a 70 $\mu g\ kg^{-1}$ de Cd.

Tabela 5.3 – Teores de Cd encontrados em ingredientes vegetais fornecidos aos animais durante o experimento

Fonte	Matriz	n	Concentração (µg kg⁻¹)	Desvio-padrão (µg kg⁻¹)	C.V. (%)
Forragem	Feno	09	84,93	0,18	0,21
			84,53	1,77	2,09
			100,28	1,03	1,02
			194,17	6,78	3,49
			151,49	5,29	3,49
			130,13	4,08	3,14
			335,53*	20,84	6,21
			86,84	13,52	15,56
			158,99	22,71	14,29
Forragem	*B. brizantha*	83	Concentração < L.Q.		
Concentrado	Milho moído	22	Concentração < L.Q.		
Concentrado	Farelo de Soja	10	Concentração < L.Q.		
Concentrado	Sorgo moído	10	14,59	1,29	8,86
			20,87	0,99	4,76
			12,30	1,57	12,77

*Concentração acima do limite permitido.
Concentração em base da matéria fresca.
Desvio-padrão e coeficiente de variação entre replicatas de mesma amostra.
n = quantidade de amostras coletadas; L.Q. = limite de quantificação (1 µg L^{-1}); C.V. = coeficiente de variação.

Tabela 5.4 – Média e intervalo de confiança das concentrações de Cd em amostras de fígado e rim bovino recebendo diferentes quantidades de milho

Tratamento	n	Rim (µg kg^{-1})	Fígado (µg kg^{-1})
Tratamento 1	9	49,34 (33,17 – 73,40)	< L.Q.
Tratamento 2	9	69,07 (45,71 – 104,38)	< L.Q.
Tratamento 3	9	48,01 (36,97 – 62,35)	< L.Q.

Dados retransformados (10^x), (x,y) intervalo de confiança de 95%.
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste t a 5% de significância.
Concentração em base da matéria fresca.
n = quantidade de amostras coletadas; L.Q. = limite de quantificação (22 µg kg^{-1});

Os resultados de fígado e rim estão de acordo com os dados da literatura que indicam o rim como principal tecido de acumulação de Cd (aproximadamente metade do Cd existente no corpo)

(PHILLIPS, 2004; BERTRAND et al., 1981; LISK et al., 1982; HEFFRON et al., 1980; JOHNSON et al., 1981; FOX, 1987). O Cd após absorvido no intestino liga-se as albuminas do plasma e forma complexos protéicos no fígado. Estes complexos são excretados nos rins e por meio do fenômeno de endocitose ocorre liberação do Cd, o mesmo é absorvido pelas células dos túbulos proximais tornando esta área do córtex renal susceptível a danos e necroses (HOOSER, 2007).

O fato de não ter ocorrido efeito das quantidades de milho, fornecidas durante o período de pastejo, sobre os teores de Cd nos tecidos animais foi esperado pois segundo Hooser (2007) a absorção de Cd em bovinos é menor que 16% (dependendo da dose), ou seja, com os teores encontrados no milho esperava-se baixa acumulação. Bertrand et al. (1981) comentam que ingestão de Cd de até aproximadamente 0,5 mg kg^{-1} dia^{-1} são seguros a saúde animal não gerando grande bioacumulação.

As análises em tecido animal não são realizados em porções de músculo devido o mesmo constituir porção nobre da carcaça e também já ser bem descrito pela literatura que este tecido não é bioacumulador, logo com análises de tecido renal dentro dos limites máximos permitidos de Cd o restante dos tecidos da carcaça seguramente não apresentarão quantidades preocupantes (BERTRAND et al., 1981; HEFFRON et al., 1980; FOX, 1987; HEFFRON et al., 1980).

Não foram encontradas violações nas amostras de carne analisadas. Este resultado enquadra-se no histórico de análises de rim em animais de todo o país publicado pelo MAPA por meio do PNCRC. As violações com Cd em rins bovinos são publicados no Diário oficial da União anualmente no site do MAPA, cujas porcentagens de violação nos últimos 4 anos foram de 0,44%, 0,45%, 0,39% e 0,97% (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

5.4 Conclusão

Os resultados de Cd encontrados nas diversas amostras coletadas durante todo o experimento indicam que o produto animal provem de sistema de produção isento, pois permaneceu dentro dos limites permitidos pelas legislações nacionais e internacionais. Os ingredientes utilizados na alimentação animal, tanto durante a fase de pastejo quanto de confinamento, estiveram dentro dos limites aceitáveis de Cd.

Referências

ADAMS, M.L; CHAUDRY, A.M.; ROUSSEAU, I; McGRATH, S. A practical evaluation of microwave and conventional wet digestion techniques for the determination of Cd, Cu And Zn in wheat grain. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry,** Abingdon, v. 83, n. 4, p. 307 – 314, Apr. 2003.

AITKEN, M.N. Short-term leaf surface adhesion of heavy metals following application of sewage sludge to grassland. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 52, n. 1, p. 73-85, Mar. 1997.

BERTRAND, J.E.; LUTRICK, M.C.; EDDS, G.T.; WEST, R.L. Metal residues in tissues, animal performance and carcass quality with beef steers grazing pensacola bahiagrass pastures treated with liquid digested sludge. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 53, p. 146 – 153, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 518, de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518.pdf. Acesso em 04 abr. 2011.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 42 de 31 de dezembro de 2008. Institui o plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal - PNCRC/Vegetal. **Diário Oficial da União**. 05 jan. 2009. Seção 1, p. 1 – 8.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 5 de agosto de 2008. Publica, na forma do anexo a presente instrução normativa, os resultados do monitoramento dos analitos incluídos aos programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, suína, aves e equina) e pescado, durante o exercício do PNCRC/2007. **Diário Oficial da União**. 07 ago. 2008. Seção 1, p. 1 – 4.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 15 d 25 de maio de 2009. Publicar os resultados do monitoramento dos programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, suína, aves e equina), leite, ovos, mel e pescado do exercício de 2008. **Diário Oficial da União**. 28 mai. 2009. Seção 1, p. 1 – 8.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 6, de 16 de março de 2010. Publicar os resultados do acompanhamento dos programas de controle de resíduos e

contaminantes em carnes (bovina, suína, aves e equina), leite, ovos, mel e pescado do exercício de 2009. **Diário Oficial da União**. 23 mar. 2010. Seção 1, p. 1 – 7.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 6, DE 25 DE FEVEREIRO DE 2011. Publicar os resultados do acompanhamento dos programas de controle de resíduos e contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em carnes (bovina, suína, aves e equina), leite, ovos, mel e pescado do exercício de 2010. **Diário Oficial da União**. 28 fev. 2011. Seção 1, p. 1 – 7.

BRASIL. Decisão de diretoria n. 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 3 maio 2006.

Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Brazil). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Serviço de Produção de Informação, 1999, 412 p.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 1881/2006, de 19 de Dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 20 Dezembro. 2006, p. 5 - 24.

COMUNIDADE EUROPÉIA. Regulamento (CE) nº 629/2008, de 02 de julho 2008. Altera o Regulamento (CE) nº 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, Bruxelas, 3 de Julho de 2008. p. 6 – 9.

COSTA, D.F.A. **Respostas de bovinos de corte à suplementação energética em pastos de capim-marandu submetidos a intensidades de pastejo rotativo durante o verão**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

DOWDY, R.H.; VOLK, V.V. Moviment of heavy metals in soils. In: D.W. Nelson, chmn.; D.E. Elrick, K.K. Tanji. **Chemical mobility and reactivity in soil systems:** proceedings of a symposium. Madison: Soil Science Society of America, 1983. chap. 15, p. 229 – 240.

FAGUNDES, J.L.; **Efeitos de intensidades de pastejo sobre o índice área foliar, interceptação luminosa e acúmulo de forragem em pastagens de *Cynodon* spp**. Piracicaba, 1999. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

FOX, M.R.S. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 65, p. 1744 – 1752, 1987.

HEFFRON, C. L. ;REID, J.T. ;ELFVING, D.C.;STOEWSAND, G.S.; HASCHEK,W.M.; TELFORD, J.N.; FURR, K.A.;PARKINSON, T.F. ;BACHE, C.A.; GUTENMANN, W.H. Cadmium and zinc in growing sheep fed silage corn grown on municipal sludge-amended soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 1, p. 58-61, Jan. 1980.

HOOSER, S.B. Cadmium. In: GUPTA, R. C (Ed). **Veterinary toxicology**: basic clinical principles. New York: Academic Press, 2007. chap. 27, p. 422 – 426.

JOHNSON, D.E.; KIENHOLZ, E.W.; BAXTER, J.C.; SPANGLER, E.; WARD, G.M. Heavy metal retention in tissues of cattle fed high cadmium sewage sludge. **Journal Animal Science**. Savoy, v. 52, n. 1, p. 108 – 114, 1981.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soil and plants**. 3^{th} ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.

LISK, D.J.; BOYD, R.D.; TELFORD, J.N.; BABISH, J.G.; STOEWSAND, G.S.; BACHE, C.A.; GUTENMANN, W.H. Toxicologic studies with swine fed corn grown on municipal sewage sludge amended soil. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 55, n. 3, p. 623-619. 1982.

NOMURA, C.S.; OLIVEIRA, P.V. Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 234-239, Jan. 2006.

PANDEY, J; PANDEY, U. Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 148, n. 1/4, p. 61-74, 2009.

PHILLIPS, C.J.C.; CHIY, P.C.; OMED, H.M. The effects of cadmium in feed, and its amelioration with zinc, on element balance in sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 2489-2502, 2004.

ZHAO, F.J. Factors affecting the concentrations of lead in British wheat and barley grain. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 131, n. 3, p. 461-468, Oct. 2004.